

**CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES
AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER**

THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN
SCIENCES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER**

Discipline: Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

Frédéric AUGER

le 12 mars 2008

**Etude des mécanismes d'agglomération du gluten au cours du
pétrissage de suspensions farine-eau**

JURY

M. C. SANCHEZ	Professeur, ENSAIA, Nancy	Président du Jury
M. J. LEGRAND	Professeur, Université de Nantes, St-Nazaire	Rapporteur
Mme C. MICHON	Professeur, AgroParisTech, Massy	Rapporteur
M. S. GUILBERT	Professeur, Montpellier SupAgro, Montpellier	Directeur de thèse
Mme M.H. MOREL	Chargée de Recherches, INRA, Montpellier	Examineur
Mme A. WAGNER	Directrice R&D, Syral, Marckolsheim	Examineur

**CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES
AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER**

THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN
SCIENCES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER**

Discipline: Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

Frédéric AUGER

le 12 mars 2008

**Etude des mécanismes d'agglomération du gluten au cours du
pétrissage de suspensions farine-eau**

JURY

M. C. SANCHEZ	Professeur, ENSAIA, Nancy	Président du Jury
M. J. LEGRAND	Professeur, Université de Nantes, St-Nazaire	Rapporteur
Mme C. MICHON	Professeur, AgroParisTech, Massy	Rapporteur
M. S. GUILBERT	Professeur, Montpellier SupAgro, Montpellier	Directeur de thèse
Mme M.H. MOREL	Chargée de Recherches, INRA, Montpellier	Examineur
Mme A. WAGNER	Directrice R&D, Syral, Marckolsheim	Examineur

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Montpellier SupAgro/INRA de l'UMR IATE 1208 "Ingénierie des Agro-polymères et des Technologies Emergentes", avec le soutien financier du groupe Tate & Lyle. Ce travail est le fruit d'une excellente collaboration entre les acteurs directs et indirects du projet de thèse, et je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation et à son bon déroulement.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à M. le Professeur Stéphane Guilbert, Directeur de l'UMR IATE et Directeur de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe et confié ce travail de recherche. Je souhaite également adresser mes remerciements les plus sincères à Mme Marie-Hélène Morel, Chargée de recherches INRA, qui fut l'encadrante principale de ce travail et avec qui j'ai travaillé avec plaisir et satisfaction pendant ces trois années. Marie-Hélène, par son implication forte dans mon projet de thèse du premier au dernier jour, par sa disponibilité, par sa rigueur et par son expérience professionnelle et ses connaissances scientifiques hors paires, m'a apporté des bases scientifiques solides et de qualité qui ont contribué de façon très bénéfique à ma formation de chercheur et, bien sûr, à la qualité scientifique de ce travail. Je garderai un excellent souvenir de notre collaboration !

J'adresse également mes plus vifs remerciements à toute l'équipe "protéines" du centre de recherche du groupe Tate & Lyle, qui a permis la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions et qui m'a accueilli dans ses locaux à plusieurs reprises. Ce partenariat industriel fut remarquable et je tiens à remercier plus particulièrement M. Geert Maesmans, M. Andreas Redl et Mme Muriel Dewilde qui ont participé de manière très active à l'encadrement de cette thèse malgré l'éloignement géographique. Par leur intérêt constant dans mon travail, ils ont su me donner une source supplémentaire de motivation. J'en profite également pour remercier Patrick, Stefan, Christine, Wim, Dirk, Sofie, Luc, Virginie, Patricia, Annick et Maria pour leur gentillesse et leur aide technique ou scientifique au sein de Tate & Lyle.

Je remercie Mme Camille Michon, Professeur à AgroParisTech Massy, et M. Jack Legrand, Professeur à l'Université de Nantes, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Mme Anne Wagner, Directrice R&D de Syral, pour avoir accepté de participer au jury de thèse et M. Christian Sanchez, Professeur à l'ENSAIA, pour avoir assuré la présidence de ce jury.

Mes remerciements s'adressent d'autre part à tous les membres du laboratoire, et de l'UMR dans sa globalité, pour leur contribution tout au long de ces trois années. Je remercie Joëlle pour son investissement important dans mes expériences, sa disponibilité, sa bonne humeur mais surtout pour son sérieux et la qualité de ses analyses. Je remercie également Thérèse-Marie pour sa maîtrise incontestée de l'alvéographe Chopin, Anne-Marie et Christophe pour leur aide administrative précieuse et leurs sujets de conversation tellement contrastés, Bernard, Stéphane, Valérie et Hélène pour m'avoir donné à plusieurs reprises l'occasion de donner des cours à leurs étudiants, Christian et Michel pour les réparations d'urgence toujours efficaces, Joël pour m'avoir donné l'occasion de piloter l'organisation du 6^{ème} congrès européen des jeunes scientifiques céréaliers, Marc, Georges, Nicole, Rallou, Carole, Domi, Valérie, Caroline, Xavier, Marie-Françoise, Cécile, Fred, Luc, Abelkrim et Robert pour leur aide ponctuelle, mais tellement utile et appréciable dans un travail de thèse. Un grand merci bien sûr aux "filles" de l'algeco (Milena, Youna, Maud, Gisela, Gabriela, Mariana, Magalie et Rémi) et aux "garçons" de l'annexe (Paul, Rémi, Moustafa, Denis, Alex, Abdé, Virginie et Thiranan) qui ont été d'excellents collègues de bureau et avec qui j'ai passé de très bons moments.

J'adresse également mes remerciements aux personnes initialement extérieures au projet de thèse et dont le partenariat a été grandement utile à ce travail. Je remercie M. Jacques Lefèbvre, Directeur de recherches à l'INRA de Nantes, pour son aide en rhéologie, M. Guillaume Delaplace, Chargé de recherches à l'INRA de Lille, pour son aide dans la calibration du pétrin, Mrs. Jean-Louis Porreye et Thierry Delaunay, Chargés de l'audiovisuel à Montpellier SupAgro, pour leur aide en photographie, et M. Olivier Ballesteros, étudiant à Montpellier SupAgro, pour son aide technique dans mes travaux de recherche lors de son stage de 1^{ère} année d'ingénieur.

Enfin, je dédie cette thèse à ma famille, à mes parents, et à celle qui a partagé ces trois années de travail intensif à mes côtés, pour leur exprimer mon amour et ma reconnaissance.

A tous ceux qui veulent faire une thèse, renseignez-vous bien ! Le jeu en vaut la chandelle mais cette formation est très exigeante et souvent difficile. Réfléchissez et encadrez-vous bien !

A tous ceux qui sont déjà en thèse, ce n'est plus le moment de réfléchir ! Foncez, diversifiez vos compétences et vos activités et trouvez un intérêt et une valorisation future de tout ce que vous faites !

A tous ceux qui viennent de terminer leur thèse, quel bonheur n'est-ce pas ! A présent, vendons-nous car nous avons mille et une compétences à partager !

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	17
-------------------------------	-----------

INTRODUCTION	23
---------------------	-----------

CHAPITRE 1 – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	29
--	-----------

I. Le grain de blé.....	31
II. Les constituants de la farine de blé.....	33
II.1. L'amidon.....	33
II.2. Les protéines.....	35
II.3. Les arabinoxylanes.....	39
II.4. Les lipides.....	40
III. Le gluten: composition et structure.....	40
IV. De la farine à la pâte: l'opération de pétrissage.....	46
V. Procédés d'extraction du gluten.....	51
VI. Méthodologie retenue pour l'étude.....	53

CHAPITRE 2 – ÉTUDE PARAMÉTRIQUE DE L'OPÉRATION DE PÉTRISSAGE SUR LE DÉVELOPPEMENT OPTIMAL DU RÉSEAU DE GLUTEN	57
--	-----------

<i>Chapitre 2A – Influence de l'hydratation et de la vitesse de pétrissage sur le développement optimal du réseau de gluten.....</i>	59
---	-----------

OBJECTIF.....	59
---------------	----

PUBLICATION N°1: A PARAMETRIC AND MICROSTRUCTURAL STUDY OF THE FORMATION OF GLUTEN NETWORK IN MIXED FLOUR-WATER BATTER.....	61
I. Introduction.....	62
II. Experimental.....	63
II.1. Flours.....	63
II.2. Dough formulation and mixing characteristics.....	64
II.3. In situ protein staining and dough observation.....	65
III. Results.....	65
III.1. Flour characteristics.....	65
III.2. Typical flour-water batter mixing curves from Orvantis, Caphorn and Isengrain.....	66
III.3. Effect of mixing speed on baseline torque and peak development time.....	67
III.4. Effet of flour/water ratio on baseline torque and peak development time.....	69
III.5. Protein phase distribution during dough mixing.....	71
IV. Discussion.....	73
V. Conclusion.....	78

RESUME/CONCLUSION.....	79
------------------------	----

Chapitre 2B – Calibration rhéologique du pétrin P600.....	81
OBJECTIF.....	81
PUBLICATION N°2: POWER CONSUMPTION OF A PLANETARY MIXER: APPLICATION FOR THE DETERMINATION OF APPARENT SHEAR RATE AND VISCOSITY OF FLOUR-WATER BATTERS.....	
	83
I. Introduction.....	84
II. Experimental.....	86
II.1. <i>Mixing equipment</i>	86
II.2. <i>Mixed fluids</i>	88
II.3. <i>Viscous properties of mixed fluids</i>	88
III. Theoretical Aspects.....	89
III.1. <i>Dimensional analysis for a conventional agitated vessel</i>	89
III.2. <i>Dimensional analysis for the planetary mixer bowl P600</i>	90
III.3. <i>Determination of the characteristic velocity of the planetary mixer bowl P600</i>	92
III.4. <i>Determination of K_p and K_s for the planetary mixer bowl P600</i>	95
IV. Results and Discussion.....	96
IV.1. <i>Newtonian power curve: determination of K_p</i>	96
IV.2. <i>Determination of K_s for shear-thinning fluids</i>	97
IV.3. <i>Apparent mixing rates and viscosities encountered in the mixer bowl P600 when mixing a flour-water batter</i>	98
V. Conclusion.....	100
VI. Appendices.....	101
RESUME/CONCLUSION.....	103

**CHAPITRE 3 – EXTRACTION ET QUALITE DU GLUTEN EXTRAIT
A L’OPTIMUM DE PETRISSAGE 105**

***Chapitre 3A – Influence du pétrissage sur le rendement d’extraction
et la composition du gluten à t_{peak} 107***

OBJECTIF.....	107
---------------	-----

PUBLICATION N°3: INFLUENCE OF MIXING ON GLUTEN PROTEIN RECOVERY AND COMPOSITION. I. EXTRACTION FROM OPTIMALLY DEVELOPED BATTERS.....	
	109
I. Introduction.....	110
II. Experimental.....	112
II.1. <i>Flours</i>	112
II.2. <i>Gluten isolation</i>	112
II.2.1. <i>Mixing step</i>	112
II.2.2. <i>Washing step</i>	113
II.2.3. <i>Separation step</i>	114
II.3. <i>Flour, dough and gluten protein size distribution by SE-HPLC</i>	114
II.4. <i>Dosage of gluten disulfide groups</i>	115
II.5. <i>Gluten protein content</i>	115

III. Results.....	116
III.1. SDS-insoluble glutenin content of flours and optimally mixed batters.....	116
III.2. Gluten protein recovery.....	117
III.3. Gluten protein content.....	118
III.4. Glutenin, gliadin and albumin/globulin extraction recovery.....	119
III.5. SDS-insoluble glutenin content of gluten samples.....	120
III.6. Gluten disulfide content.....	123
IV. Discussion.....	124
V. Conclusion.....	129
RESUME/CONCLUSION.....	131
Chapitre 3B – Caractérisation rhéologique de glutens extraits de pâtes pétries à t_{peak} selon différentes conditions de pétrissage.....	133
OBJECTIF.....	133
PUBLICATION N°4: INFLUENCE OF SDS-INSOLUBLE GLUTENIN POLYMERS ON GLUTEN ELASTICITY FOR A CONSTANT GLUTENIN TO GLIADIN RATIO.....	135
I. Introduction.....	136
II. Experimental.....	138
II.1. Material.....	138
II.2. Rehydration and preparation of gluten samples.....	138
II.3. Gluten protein content.....	138
II.4. SE-HPLC analyses.....	139
II.5. Dynamic rheological analysis.....	139
II.6. Analysis of mechanical spectra.....	140
III. Results and Discussion.....	141
III.1. Total protein content of gluten samples.....	141
III.2. Protein size distribution of gluten samples.....	142
III.3. Viscoelastic behaviour of gluten samples.....	143
III.4. Relationship between gluten elasticity and content in SDS-insoluble glutenin.....	145
V. Conclusion.....	149
RESUME/CONCLUSION.....	151

CHAPITRE 4 – EXTRACTION ET QUALITE DU GLUTEN EXTRAIT EN SOUS- ET SUR-PETRISSAGE

153

Chapitre 4A – Influence du pétrissage sur le rendement d'extraction et la composition du gluten tout au long du pétrissage.....155

OBJECTIF..... 155

PUBLICATION N°5: INFLUENCE OF MIXING ON GLUTEN PROTEIN RECOVERY

AND COMPOSITION. II. EXTRACTION FROM UNDER- AND OVER-MIXED BATTERS..... 157

I. Introduction..... 158

II. Experimental..... 160

*II.1. Flours.....160**II.2. Gluten isolation.....160**II.2.1. Mixing step..... 161**II.2.2. Washing step..... 161**II.2.3. Separation step..... 161**II.3. Flour, dough and gluten protein size distribution by SE-HPLC..... 162**II.4. Protein content of gluten samples..... 162**II.5. Batter mixing with N-ethylmaleimide..... 163*

III. Results..... 163

*III.1. Batter mixing curves and dough samplings..... 163**III.2. Influence of mixing on the SDS-insoluble glutenin content of batters 165**III.3. Effect of NEMI during batter mixing..... 167**III.4. Influence of mixing on gluten protein recovery..... 170**III.5. Influence of mixing on glutenin, gliadin and albumin/globulin recovery.....172**III.6. Influence of mixing on gluten protein content..... 174**III.7. Influence of mixing on gluten SDS-insoluble glutenin content.....176*

IV. Discussion..... 178

V. Conclusion..... 183

RESUME/CONCLUSION..... 185

Chapitre 4B – Influence du procédé de pétrissage sur la cinétique d'agglomération des protéines du gluten in situ dans la pâte.....187

OBJECTIF..... 187

I. Matériels et Méthodes..... 188

*I.1. Farines utilisées.....188**I.2. Conditions de pétrissage.....189**I.3. Mise en place des échantillons et prise d'images..... 190**I.4. Analyse des images.....190*

II. Résultats et Discussion.....	193
II.1. Courbes de pétrissage et points de prélèvements.....	193
II.2. Suivi de l'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage.....	195
II.3. Influence du ratio farine/eau sur la cinétique d'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage.....	201
II.4. Influence de la vitesse de pétrissage sur la cinétique d'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage.....	203
II.5. Influence de la variété de farine sur la cinétique d'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage.....	206
III. Conclusion.....	210
CHAPITRE 5 – DISCUSSION GENERALE	213
<hr/>	
I. Objectifs.....	215
II. Démarche et Outils.....	217
III. Résultats.....	219
III.1. Une agglomération des protéines du gluten en deux étapes.....	219
III.2. Une agglomération liée à la dépolymérisation des gluténines.....	221
III.3. Les mécanismes de dépolymérisation possibles des gluténines.....	224
III.4. Le contrôle du développement optimal du réseau de gluten.....	227
III.5. Application des concepts obtenus à la pâte à pain.....	230
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	233
<hr/>	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	239
<hr/>	
TRAVAUX RELATIFS A CETTE ETUDE	259
<hr/>	

LISTE DES ABREVIATIONS

Alb/Glo Rec	gluten recovery in albumin and globulin (rendement d'extraction des albumines et des globulines dans le gluten)
AX	arabinoxylan (arabinoxylane)
d_G	diameter of the gyrational motion (diamètre du mouvement de giration du pétrin P600)
d_R	diameter of the rotational motion (diamètre du mouvement de rotation du pétrin P600)
DTE	dithioerythritol (dithioérythritol)
Fi	SDS-insoluble glutenin (fraction des gluténines insolubles dans le SDS)
$F_{s Non Rec}$	non-recoverable SDS-soluble glutenin (fraction des gluténines solubles dans le SDS qui ne peuvent plus se repolymériser en Fi)
$F_{s Rec}$	recoverable SDS-soluble glutenin (fraction des gluténines solubles dans le SDS qui peuvent se repolymériser en Fi)
F/W	flour/water ratio (ratio farine/eau)
G'	storage modulus (module de conservation)
G''	loss modulus (module de perte)
Gli Rec	gluten recovery in gliadin (rendement d'extraction des gliadines dans le gluten)
Glu Rec	gluten recovery in glutenin (rendement d'extraction des gluténines dans le gluten)
gluten FiRec	gluten recovery in SDS-insoluble glutenin (rendement d'extraction des gluténines insolubles dans le SDS dans le gluten)
GMP	glutenin macro polymer (macro-polymère de gluténine)
G_N°	plateau modulus (module de plateau)
GPC	gluten protein content (teneur en protéine du gluten)
GPR	gluten protein recovery (rendement d'extraction des protéines dans le gluten)
GPR_{xxx}	gluten protein recovery on the sieve with pore diameter of xxx μm (rendement d'extraction des protéines dans le gluten récupéré sur le tamis de maillage xxx μm)

H_L	height of liquid in the vessel (hauteur du fluide dans le bol du pétrin)
HMW-GS	high molecular weight glutenin subunit (sous-unité gluténine de haut poids moléculaire)
H_T	height of the impeller tip of the hook (hauteur de l'extrémité de la pale au sein du bol)
J'	storage compliance (complaisance de conservation)
J''	loss compliance (complaisance de perte)
J_g	glassy compliance (complaisance de l'état vitreux)
J_N°	plateau compliance (complaisance de plateau)
k	consistency index of power-law fluid (indice de consistance d'un fluide rhéo-fluidifiant)
K_p	proportionality constant of the power number (constante de calibration du pétrin P600)
K_s	Metzner and Otto's constant (constante de Metzner et Otto dans le cas du pétrin P600)
LMW-GS	low molecular weight glutenin subunit (sous-unité gluténine de faible poids moléculaire)
Mr	apparent molecular weight (poids moléculaire apparent)
ms	matière sèche
n	flow behaviour index of power-law fluid (indice d'écoulement d'un fluide rhéo-fluidifiant)
N	mixing speed (vitesse de pétrissage)
NEMI	<i>N</i> -ethylmaleimide (<i>N</i> -ethylmaléimide)
N_G	rotational speed of the gyrational motion (vitesse de pétrissage du mouvement de giration du pétrin P600)
N_p	power number (nombre de puissance)
N_{pM}	modified power number for the mixer P600 (nombre de puissance modifié pour le pétrin P600)
N_R	rotational speed of the rotational motion (vitesse de pétrissage du mouvement de rotation du pétrin P600)
$N.t_{peak}$	number of mixing revolutions required to get the optimal dough development (nombre de rotations du bras central du pétrin P600 nécessaire à l'obtention de l'optimum de développement de la pâte)

$N.t_s$	number of mixing revolutions (nombre de rotations du bras central du pétrin P600)
P	power consumption of the mixer (puissance)
Re	Reynolds number (nombre de Reynolds)
Re_M	modified Reynolds number for the mixer P600 (nombre de Reynolds modifié pour le pétrin P600)
SE-HPLC	size exclusion high pressure liquid chromatography (chromatographie liquide haute pression d'exclusion stérique)
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodécyl sulfate de sodium)
SME	specific mechanical energy (énergie mécanique spécifique)
t	time (temps)
$\tan \delta = G''/G'$	loss tangent (tangente de perte)
t_{peak}	time for optimal dough development (temps de pétrissage nécessaire à l'obtention de l'optimum de développement de la pâte)
t_s	sampling mixing time (temps de pétrissage au moment du prélèvement)
u_{ch}	characteristic velocity (vitesse caractéristique du pétrin P600)
$u_{impeller\ tip}$	instantaneous impeller tip speed of the hook (vitesse instantanée de l'extrémité de la pale du pétrin P600)
UPP	unextractable polymeric protein (résidu protéique polymérique non extractible)
WEAX	water extractable arabinoxylan (arabinoxylane soluble)
Γ	torque (couple)
Γ_b	baseline torque (couple de base obtenu durant la phase de latence)
$\dot{\gamma}$	apparent shear rate (vitesse de cisaillement apparente)
θ	temperature (température)
ρ	fluid density (densité du fluide)
η_b	apparent baseline viscosity (viscosité apparente de la pâte durant la phase de latence)
ω	angular frequency (fréquence angulaire)
ω_0	angular frequency of the loss compliance peak (fréquence angulaire du pic de la complaisance de perte)

INTRODUCTION

Le blé est l'une des trois céréales les plus cultivées dans le monde, avec le riz et le maïs. Sa production mondiale annuelle atteint 600 millions de tonnes (FAO, 2006), soit près de 38% de la production totale de céréales. Le blé suscite autant d'intérêt pour deux raisons principales. Tout d'abord, comme toutes les céréales, le blé est riche en amidon et en protéines, ce qui en fait l'une des principales ressources alimentaires de l'homme. Mais surtout, le blé se distingue des autres céréales par la capacité unique de sa farine à former une pâte visco-élastique dont les propriétés rhéologiques remarquables permettent la fabrication d'aliments aussi diversifiés que les pains, pâtes alimentaires ou biscuits. Cette aptitude unique, faisant du blé la seule céréale panifiable, réside dans la spécificité de ses protéines de réserve, gluténine et gliadine, qui ont la capacité de s'associer entre elles pour former un réseau protéique visco-élastique appelé "gluten".

On sait aujourd'hui que le réseau de gluten se développe au cours du pétrissage de mélanges farine-eau. Il se manifeste par l'apparition de propriétés visco-élastiques, le réseau tridimensionnel de gluten englobant alors l'eau et les grains d'amidon de la farine. Comment les protéines de réserve du blé, qui représentent à peine 10% de la farine, peuvent-elles s'associer pour former un tel réseau capable de supporter la charge de l'eau et de l'amidon ? Quel est le rôle des constituants de la farine et de l'eau apportée ? Quelle est l'action du pétrin ? Est-il possible de maîtriser la vitesse et le degré de développement du réseau de gluten au cours du pétrissage, et comment ? Il est actuellement difficile de répondre précisément à l'une de ces questions car les mécanismes qui sous-tendent à l'agglomération des protéines du gluten ne sont toujours pas connus. Pourtant, comprendre l'opération de pétrissage et l'agglomération du gluten d'un point de vue mécanistique permettrait de maîtriser cette opération unitaire, fondamentale pour toutes les industries céréalières comme la boulangerie, la biscuiterie, les industries pastières ou l'amidonnerie. Dans toutes ces industries, le degré de développement du réseau de gluten conditionne la qualité des produits finis. Par conséquent, connaître les mécanismes impliqués dans l'agglomération du gluten permettrait de maîtriser la formation ou non de ce réseau, et ainsi de contrôler la qualité des produits finis dès le début du procédé.

Dans le cas de l'industrie amidonnière, l'agglomération du gluten est un sujet d'étude tout aussi critique puisqu'elle est recherchée. Cette industrie fractionne le blé pour en extraire l'amidon bien sûr, or blanc pour cette industrie, mais aussi le gluten, qu'elle valorise essentiellement en boulangerie, en tant qu'agent de renforcement des farines. Or, l'extraction

du gluten nécessite que les protéines soient suffisamment agglomérées pour les séparer des grains d'amidon. C'est pourquoi tous les procédés d'extraction du gluten débutent par une étape de pétrissage. Toutefois, on peut relever dans la littérature une multitude de procédés d'extraction, très différents les uns des autres. Industriellement, la situation est la même, pour autant que l'on puisse le savoir, compte-tenu de la culture du secret qui prévaut dans ce secteur. Cet état de fait montre que des progrès technologiques peuvent encore être réalisés pour optimiser et standardiser l'extraction du gluten et de l'amidon à partir du blé. Or, on peut penser qu'une meilleure connaissance des mécanismes d'agglomération du gluten se produisant au cours du pétrissage le permettrait très certainement. Une meilleure standardisation permettrait aussi de diminuer les coûts de production, dans le but de réduire les consommations d'eau et d'énergie par exemple. Ceci a toute son importance quand on sait aujourd'hui que le coût de production de l'amidon de blé est supérieur à celui du maïs, mais que la valorisation du gluten permet de compenser ce surenchérissement. C'est dans ce contexte industriel très compétitif que l'activité blé du groupe britannique Tate & Lyle, récemment reprise par la société française Syral, souhaite approfondir ses connaissances scientifiques sur les propriétés d'agglomération des protéines du gluten. Ceci dans le but d'améliorer son procédé d'extraction et de standardiser ses rendements, sans toutefois altérer la qualité du gluten obtenu.

Ce travail de thèse, effectué dans le cadre d'une convention Cifre en partenariat avec la société Tate & Lyle et l'unité mixte de recherche "Ingénierie des Agro-polymères et des Technologies Emergentes" (UMR IATE, 1208), a pour objectif d'identifier les mécanismes et les lois qui président à l'agglomération des protéines du gluten au cours de l'opération de pétrissage. Cette étude doit permettre de mieux maîtriser le degré et la vitesse de développement du réseau de gluten et d'en prédire son développement optimal en fonction des conditions de pétrissage. Pour cela, l'étude s'est portée parallèlement sur deux systèmes: la pâte, pour suivre les modifications protéiques, et le gluten extrait de cette même pâte, pour mesurer le degré d'agglomération du gluten et sa qualité.

Dans un premier temps, l'étude s'est focalisée sur l'effet de la vitesse de pétrissage et de l'hydratation d'empilage sur le temps de développement optimal du réseau de gluten, afin de prédire l'apparition de cet état de développement. Cette étude paramétrique a été complétée par la calibration du pétrin utilisé, dans le but d'accéder aux vitesses de cisaillement mises en oeuvre dans le pétrin et à la viscosité de la pâte. Ceci de façon à pouvoir envisager à terme le transfert des connaissances acquises sur un pilote de laboratoire vers des

mélangeurs industriels. Dans un second temps, l'étude s'est focalisée sur l'influence des conditions de pétrissage sur la qualité biochimique et rhéologique du gluten extrait à l'optimum de développement de la pâte. Enfin, l'étude a été élargie par le suivi des modifications protéiques se produisant tout au long du pétrissage, aussi bien dans la pâte (coloration des protéines, distribution de taille des protéines) que dans le gluten extrait au cours du pétrissage. Par ailleurs, toute l'étude a été réalisée à partir de trois variétés de blé pures: Orvantis, Caphorn et Isengrain.

Les principaux résultats acquis au cours de la thèse sont présentés sous la forme de cinq publications rédigées en langue anglaise et d'un chapitre rédigé en français. La rédaction des résultats sous forme de publications a pour objectif de valoriser dès à présent les travaux de recherche à l'international. Toutefois, par souci de clarté, le restant du manuscrit de thèse est rédigé en français. Ce manuscrit a été structuré en cinq chapitres:

- Le **chapitre 1** consiste en une **synthèse bibliographique** dont l'objectif est de rappeler les bases biochimiques de la farine de blé et du gluten. Ce chapitre présente également les différents procédés d'extraction du gluten et l'importance du pétrissage dans cette industrie particulière.
- Le **chapitre 2** est consacré à l'**étude paramétrique** du développement du gluten. Pour cela, la publication n°1 présente une équation constitutive permettant de prédire le temps de pétrissage nécessaire au développement optimal du réseau de gluten en fonction de la vitesse de pétrissage et de l'hydratation de la pâte. La publication n°2 propose une méthode permettant de calibrer le pétrin utilisé et d'exprimer ainsi la consistance de la pâte en viscosité (Pa.s) et la vitesse de pétrissage en vitesse de cisaillement (s^{-1}). Cette étude vise à permettre un meilleur transfert des résultats obtenus dans la publication n°1.
- Le **chapitre 3** est consacré à l'**extraction du gluten à l'optimum de pétrissage**. La publication n°3 présente l'influence des conditions de pétrissage sur la composition biochimique des glutens extraits à l'optimum de pétrissage. Elle permet de souligner l'importance de l'historique du pétrissage qui affecte grandement la qualité biochimique du gluten. La qualité rhéologique des différents glutens extraits dans la publication n° 3 est, quant à elle, étudiée dans la publication n° 4. Celle-ci s'intéresse plus

particulièrement à la relation qui lie l'élasticité des glutens obtenus en fonction de leur teneur en polymères de gluténine insolubles dans le SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium).

- Le **chapitre 4** est consacré cette fois-ci à l'**extraction du gluten en sous- et sur-pétrissage**. La publication n°5 présente les modifications protéiques se produisant tout au long du pétrissage. De plus, la qualité biochimique du gluten extrait au cours du pétrissage est présentée afin de suivre les processus d'agglomération du gluten. L'agglomération des protéines se produisant au cours du pétrissage est également suivie à une échelle plus macroscopique dans la seconde partie rédigée en français. Dans celle-ci, les protéines de la pâte ont été colorées spécifiquement afin de suivre leur morphologie et leur nombre tout au long du pétrissage, et cela pour différentes conditions de pétrissage.
- Le **chapitre 5** est une **discussion générale** qui synthétise l'ensemble des travaux et devrait permettre d'avoir une meilleure connaissance des mécanismes d'agglomération du gluten se produisant au cours de l'opération de pétrissage.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le grain de blé

Le blé est une monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des *Graminae*. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec appelé caryopse constitué d'une graine et de téguments. La structure d'un grain de blé mature est présentée en Fig. 1.1. De la surface externe vers le centre du grain, on distingue (Posner, 2000; Surget et Barron, 2005):

- les enveloppes du fruit et de la graine (13-17% du grain): formées du péricarpe externe, du péricarpe interne, du testa et de l'épiderme du nucelle ou bande hyaline, ces enveloppes sont riches en fibres, en vitamines et en minéraux (Izydorczyk et Biliaderis, 1995);
- l'albumen (80-85% du grain): il est constitué de l'albumen amylicé, qui contient des cellules très compactes remplies de grains d'amidon dispersés au sein d'une matrice protéique, et de la couche à aleurone, riche en protéines, lipides, micro-nutriments et dont les parois sont constituées majoritairement d'arabinoxylanes (Posner, 2000);
- le germe (2-3% du grain): composé de l'axe embryonnaire, comprenant la gemmule, et du scutellum, correspondant au cotylédon embryonnaire, il est le siège de l'activité biologique du grain et contient de très nombreuses enzymes et des lipides (Swift et O'Brien, 1972).

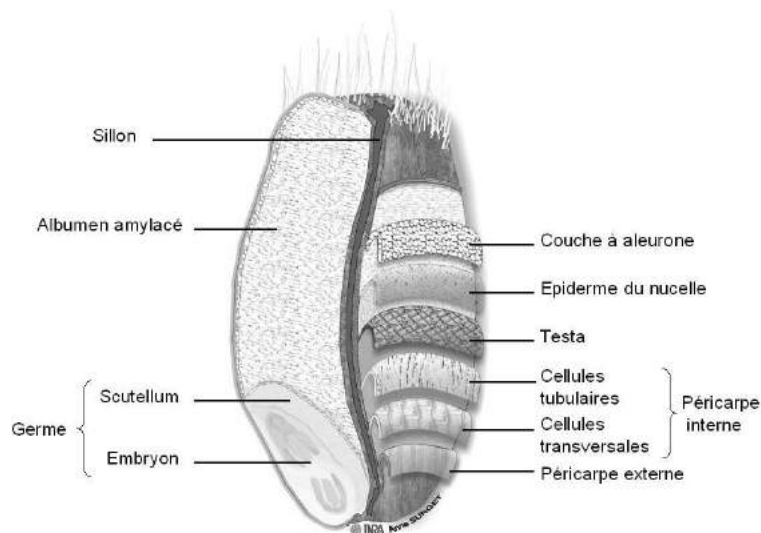


Fig. 1.1: Schéma du grain de blé (Surget et Barron, 2005).

L'amidon et les protéines sont essentiellement présents dans les cellules de l'albumen, à hauteur de 100% et 89%, respectivement (Feillet, 2000). On trouve également des protéines dans les cellules du germe (7%) et du péricarpe (4%), mais il ne s'agit pas de protéines du gluten (Feillet, 2000). On comprend mieux pourquoi l'opération de mouture du grain de blé a

pour but d'isoler l'albumen amylicé des autres constituants du grain. La farine ou la semoule qui en résulte se trouve ainsi très enrichie en amidon et en protéines du gluten, les deux constituants d'intérêt majeur pour toutes les industries céréalières.

Les deux espèces de blé les plus cultivées dans le monde sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) mais il existe de nombreuses autres espèces de *Triticum*. Ces deux espèces se différencient technologiquement par la friabilité de l'albumen, qui est beaucoup plus importante pour le blé tendre que pour le blé dur. Cette caractéristique permet la transformation du blé tendre en farines, constituées de fines particules (inférieures à 200 µm), tandis que le blé dur est plus apte à être transformé en semoules, constituées de particules plus grossières (inférieures à 600 µm). Le blé tendre est utilisé en boulangerie, en biscuiterie et en amidonnerie, tandis que le blé dur est utilisé pour la fabrication de pâtes alimentaires, de semoules ou de couscous. Chacune de ces espèces compte plusieurs variétés dont les caractéristiques agronomiques et technologiques sont très diverses. Cette diversité s'amplifie également par le fait que le blé est cultivé dans le monde entier, sur différents sols et sous différents climats.

Au cours de cette étude, nous nous intéresserons uniquement au blé tendre, qui est classé suivant son indice de dureté (hard, medium-hard ou soft) dans les pays anglo-saxons. Ce classement, qui s'effectue sur la base d'un critère physique et qui sert surtout aux meuniers, n'est pas utilisé pour déterminer la valeur commerciale d'un blé en France. En effet, celle-ci se calcule par rapport à l'utilisation pour laquelle le blé est destiné, par rapport à sa teneur en protéines et par rapport à la demande mondiale. En France, le blé tendre est classé exclusivement suivant sa valeur boulangère. Cela s'explique par le fait que la boulangerie représente le premier débouché de la filière avec 58% des ventes, contre 34% pour l'alimentation animale et 8% pour les autres usages dont l'amidonnerie. De façon générale, on distingue le blé panifiable supérieur (BPS), le blé panifiable courant (BP), le blé améliorant de force (BAF), le blé biscuitier (BB) et le blé pour autre usage (BAU). Seul le "blé amidonnier" n'est toujours pas défini aujourd'hui car il n'existe aucun classement officiel pour évaluer la qualité d'un blé en amidonnerie. Toutefois, la qualité première d'un blé réside avant tout dans sa composition biochimique, présentée ci-après.

II. Les constituants de la farine de blé

La farine de blé provient essentiellement du broyage de l'albumen amylicé et se présente sous la forme d'une poudre constituée de très fines particules (inférieures à 200 μm). Elle se compose d'amidon (70-80% ms), de protéines (8-18% ms), de polysaccharides non amylicés (2-3% ms), de lipides (1.5-2.5% ms) et de matières minérales (0.4-0.8% ms) (MacRitchie, 1984; Meuser et Suckow, 1986).

II.1. L'amidon

L'amidon est le constituant majoritaire de la farine (Feillet, 2000). C'est aussi le premier élément d'intérêt de la farine de blé car c'est un glucide complexe qui constitue une source énergétique importante pour l'homme. Dans la farine, il se présente sous la forme de grains durs non déformables. On distingue (Evers, 1971; Karlsson et al., 1983; Soulaka et Morrison, 1985) (Fig. 1.2):

- les grains de type A, les plus gros (20-25 μm) et lenticulaires
- les grains de type B, plus petits (2-10 μm) et sphériques

Les grains de type A représentent plus de 90% en poids et moins de 20% en nombre de la totalité des grains d'amidon (D'Appolonia et Gilles, 1971).

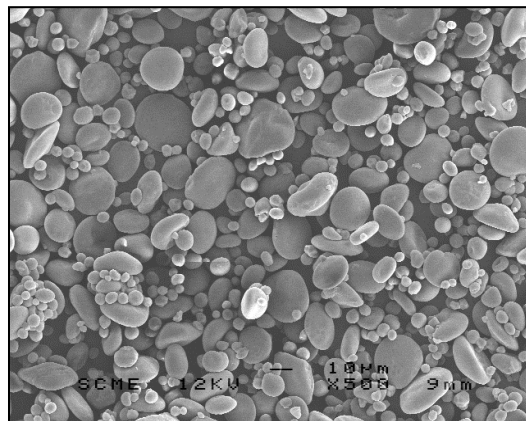


Fig. 1.2: Grains d'amidon de blé observés en microscopie électronique à balayage (Roman-Gutierrez et al., 2003a).

Ces grains d'amidon sont des entités semi-cristallines formées de deux fractions polysaccharides: l'amylose et l'amylopectine (Medcalf et Gilles, 1965), en proportions respectives de 25-30% et de 70-75% (Colonna et Buléon, 1992).

L'amylose est formée de longues chaînes linéaires de monomères de D-glucopyranose reliées par des liaisons glycosidiques en $\alpha(1-4)$ (Fig. 1.3a) et son poids moléculaire est compris entre 100 et 1 000 kDa (Hoseney, 1994). L'amylopectine est une molécule ramifiée de poids moléculaire plus élevé (10 000 à 100 000 kDa), constituée de chaînes principales de monomères de D-glucopyranose reliées par des liaisons glycosidiques en $\alpha(1-4)$, sur lesquelles des chaînes latérales identiques viennent se brancher par des liaisons $\alpha(1-6)$ (Colonna et Buléon, 1992) (Fig. 1.3b).

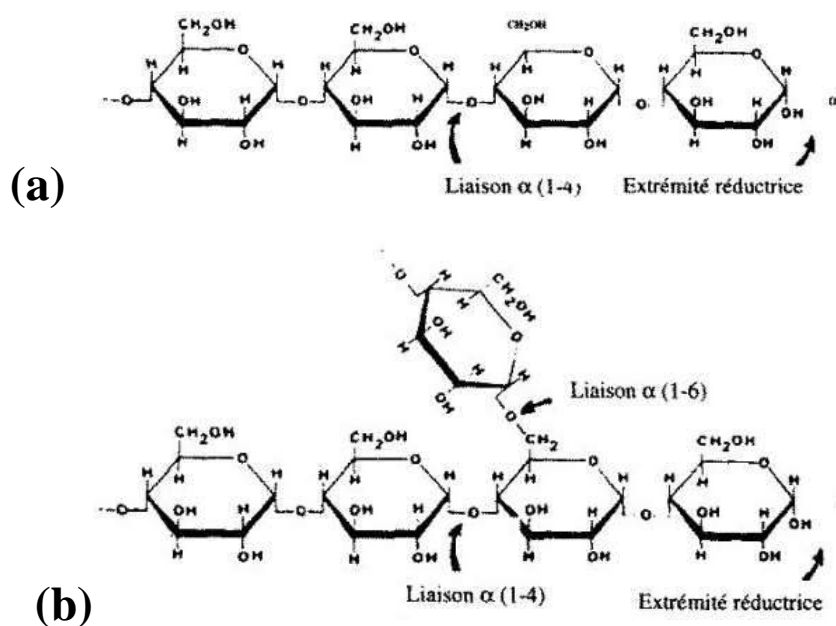


Fig. 1.3: Structure de (a) l'amylose et de (b) l'amylopectine.

Les grains d'amidon peuvent être cassés ou endommagés lors de l'opération de mouture, par les forces de compression et de cisaillement qui s'exercent sur les cellules de l'albumen. On distingue alors l'amidon natif, intact, et l'amidon endommagé. Les grains d'amidon natif sont insolubles dans l'eau à température ambiante et forment une suspension de grains qui décantent dans l'eau car la densité de l'amidon est voisine de 1.50 (Roman-Gutierrez et al., 2003b). Les grains d'amidon absorbent de l'eau, de l'ordre de 0.4-0.5 g d'eau / g de matière sèche (Greer et Stewart, 1959; Bushuk, 1966; French, 1984). L'amidon endommagé, quant à lui, absorbe trois à quatre fois plus d'eau que l'amidon natif, de l'ordre de 1.5-2.0 g d'eau / g de matière sèche (Greer et Stewart, 1959; Bushuk, 1966). La proportion d'amidon natif et d'amidon endommagé influence donc la capacité d'absorption d'eau d'une farine.

II.2. Les protéines

Les protéines constituent le second élément d'intérêt de la farine de blé. Elles sont très diversifiées en taille et en propriétés fonctionnelles et restent malheureusement très mal caractérisées car il est difficile de les solubiliser sans endommager leur structure. Osborne (1907) fut le premier à les classer en quatre groupes en fonction de leur solubilité dans différents solvants (Fig. 1.4):

- les albumines, solubles dans l'eau;
- les globulines, solubles dans les solutions salines diluées;
- les gliadines, solubles dans les alcools dilués de type éthanol 70%;
- les gluténines, insolubles dans les solvants précédents et partiellement solubles dans les solutions acides et basiques diluées.

D'autres alternatives à la classification d'Osborne ont été proposées en utilisant d'autres solvants pour solubiliser davantage les gluténines. Pour cela, on peut citer l'urée (Pomeranz, 1965) ou le dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Graveland et al., 1979). Toutefois une partie des gluténines, appelée "résidu de gluténine" par Bushuk et Wrigley (1974) ou "Glutenin Macro Polymer" (GMP) par Graveland et al. (1979), reste toujours insoluble dans les différents solvants utilisés. Plus récemment, Shewry et al. (1986) ont proposé une classification basée sur le degré de polymérisation et la teneur en acides aminés soufrés des protéines insolubles (Fig. 1.4). Dans cette classification, les gliadines forment la famille des prolamines monomériques, mélange de chaînes polypeptidiques simples de teneur variable en soufre, et les gluténines sont regroupées dans la famille des prolamines polymériques constituées de sous-unités de faible et de haut poids moléculaire, rassemblées au sein d'agrégats par des liaisons disulfures. La Fig. 1.4 permet de rapprocher ces deux classifications. Toutefois, la classification d'Osborne reste la plus utilisée.

Les albumines et globulines, minoritaires dans la farine (15-20% des protéines) (Wrigley et Bietz, 1988), constituent les protéines métaboliques du grain blé et sont regroupées sous le terme de protéines solubles ou albumine-globuline. Elles sont constituées d'un ensemble de protéines de faible poids moléculaire (10-60 kDa) et présentent généralement une activité enzymatique (Feillet, 1988).

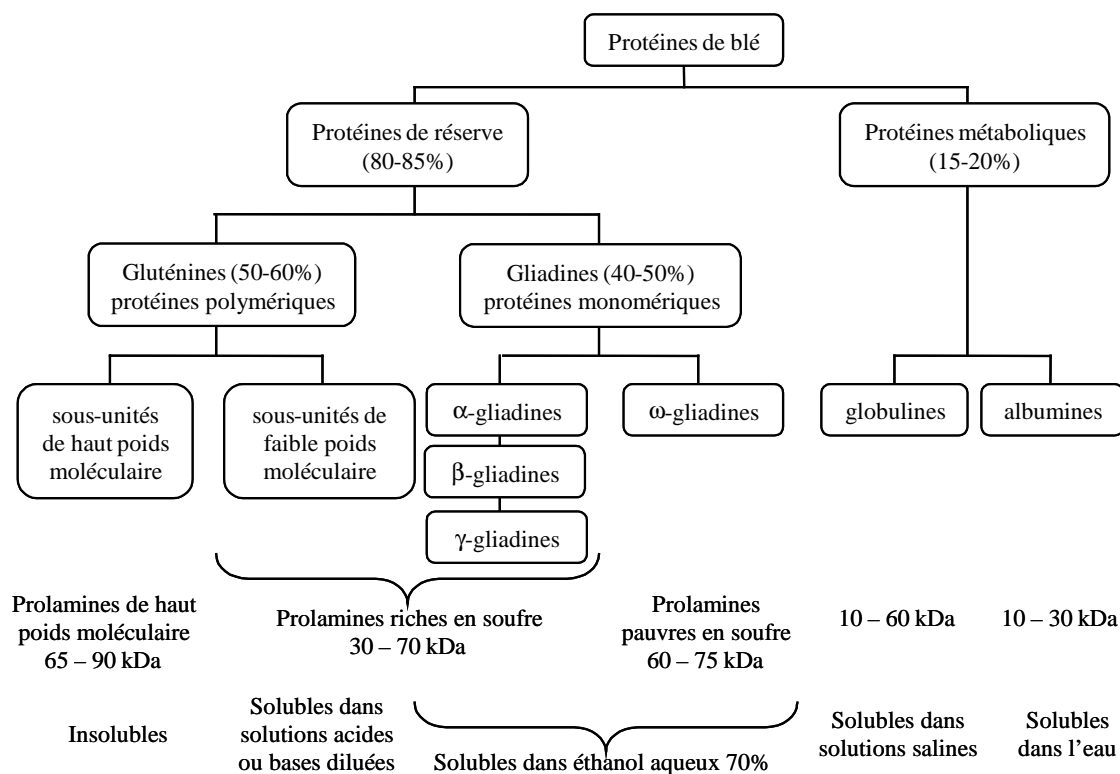


Fig. 1.4: Composition des protéines de blé: rapprochement entre les classifications d'Osborne (1907) et de Shewry *et al.* (1986).

Les gliadines et gluténines, majoritaires dans la farine (80-85% des protéines) (Wrigley et Bietz, 1988), constituent les protéines de réserve du grain de blé. Ce sont les protéines les plus importantes de la farine d'un point de vue technologique car elles sont constitutives du gluten (Pomeranz, 1988).

Les gliadines constituent un mélange hétérogène de protéines monomériques, riches en résidus glutamine et proline (Bushuk et Wrigley, 1974). Ce mélange peut être fractionné sur gel d'électrophorèse en milieu acide. On distingue alors les α -, β -, γ - et ω -gliadines, par ordre décroissant de leur mobilité (Woychik et al., 1961), et donc par ordre croissant de leur poids moléculaire. Les α -, β - et γ -gliadines présentent un poids moléculaire de l'ordre de 30-40 kDa (Bietz et Wall, 1972). Les α - et β -gliadines contiennent six cystéines tandis que les γ -gliadines en contiennent huit (Tatham et Shewry, 1985; Shewry et al., 1986; Müller et Wieser, 1995; Wieser et Müller, 1996; Shewry et Tatham, 1997). Ces cystéines, en nombre pair, sont engagées uniquement dans des liaisons intramoléculaires (Wall, 1979; Tatham et Shewry, 1985), en accord avec le fait que les gliadines sont monomériques et qu'elles ne contiennent pas de thiol libre. Les ω -gliadines se distinguent des autres gliadines par un poids moléculaire plus élevé, allant jusqu'à 75 kDa, et par l'absence totale de cystéine (Bietz et Wall, 1972).

Les gluténines constituent un mélange très hétérogène de larges protéines polymériques, dont le poids moléculaire varie de quelques centaines à plusieurs millions de Da (Huebner et Wall, 1976, 1980; Bottomley et al., 1982; Wrigley, 1996; Veraverbeke et Delcour, 2002). Après l'action d'agents réducteurs de ponts disulfures, on distingue deux grands groupes de sous-unités qui peuvent alors être définis sur la base de leur mobilité électrophorétique (Graveland et al., 1985; Lindsay et Skerritt, 1999):

- les sous-unités gluténine de faible poids moléculaire, LMW-GS (30-50 kDa)
- les sous-unités gluténine de haut poids moléculaire, HMW-GS (65-90 kDa)

Ces deux types de sous-unités gluténine sont riches en acide glutamique et en proline et contiennent entre une et plus de sept cystéines selon les sous-unités (Payne et al., 1981; Keck-Gassenmeier et Wieser, 1996; Shewry et Tatham, 1997; Masci et al., 1999). Ces sous-unités seraient liées entre elles par des liaisons disulfures intermoléculaires (Kasarda, 1989; Köhler et al., 1993), comme l'atteste l'action d'agents réducteurs. C'est d'ailleurs l'aptitude des sous-unités gluténine à s'associer par des liaisons disulfures intermoléculaires qui serait à la base des propriétés visco-élastiques de la pâte et du gluten (Ewart, 1968, 1990). Des liaisons intramoléculaires sont également possibles au sein des sous-unités gluténine.

Malheureusement la structure des sous-unités gluténine, ainsi que leur organisation sous forme de polymères de gluténine, n'est toujours pas connue car les seuls outils d'étude des gluténines restent aujourd'hui l'utilisation d'agents dénaturants et réducteurs pour les solubiliser (Kasarda et al., 1976): l'information sur leur structure est alors perdue. De ce fait, l'organisation structurale des polymères de gluténine reste spéculative et fait encore l'objet de vives discussions. De nombreux modèles d'organisation des sous-unités gluténine ont toutefois été proposés à ce jour, sans qu'aucun ne soit vraiment certain au vu des connaissances actuelles. Les principaux modèles, regroupés dans la Fig. 1.5, diffèrent selon la nature du squelette linéaire de gluténine (HMW-GS seules ou en association avec des LMW-GS), selon la position des branchements de gluténine sur le squelette et selon la nature des liaisons impliquées (pont disulfure, liaison hydrogène, hydrophobe, ...).

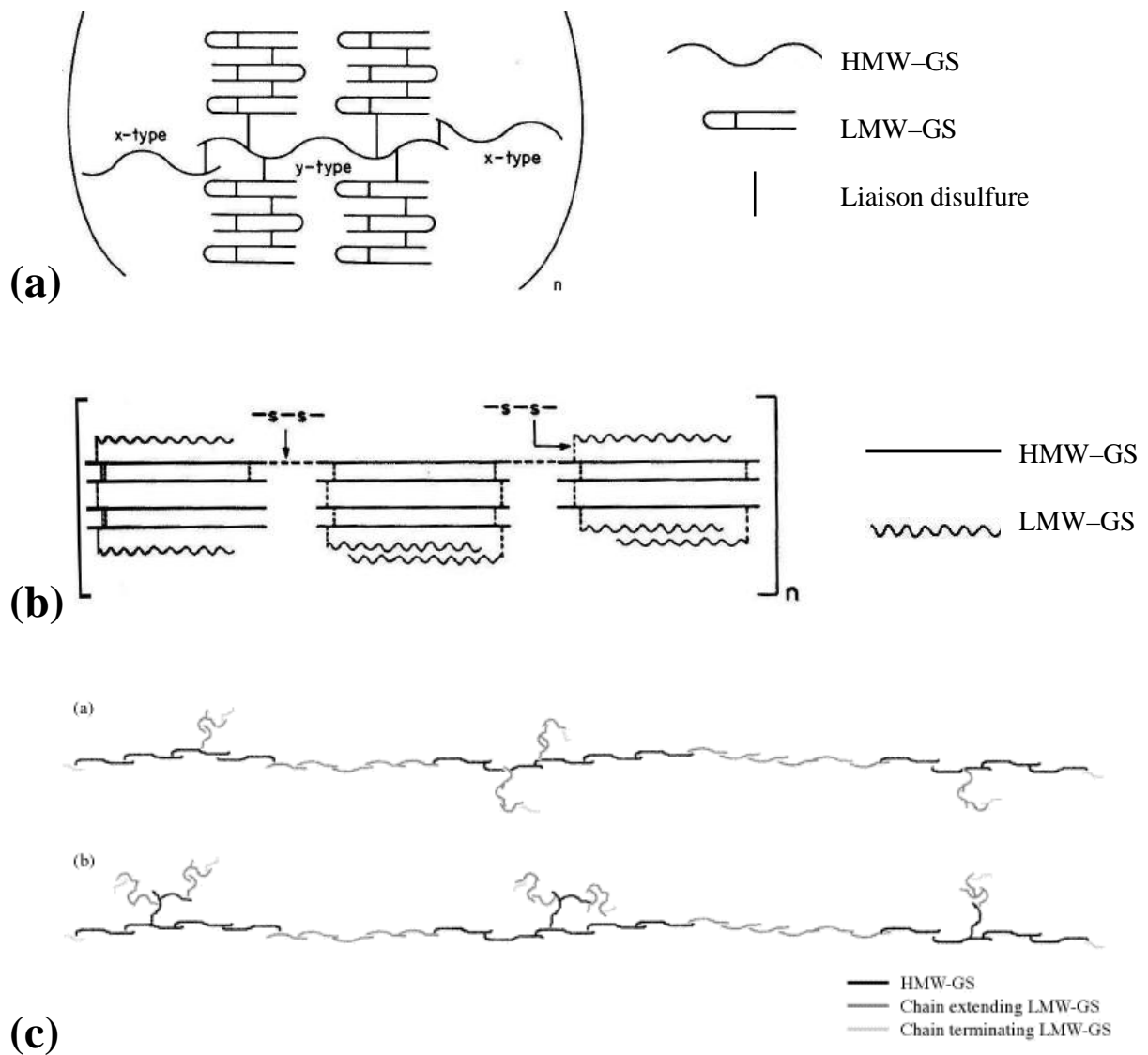


Fig. 1.5: Principaux modèles d'organisation structurale des polymères de gluténines proposés par (a) Graveland et al. (1985) (b) Gao et al. (1992) et (c) Lindsay et Skerritt (1999).

De nombreux auteurs estiment que les protéines du gluten, majoritaires parmi les protéines de la farine, absorberaient environ 1.1-2.2 g d'eau / g de matière sèche (Greer et Stewart, 1959; Bushuk et Hlynka, 1964; Larsen, 1964; Bushuk, 1966) et présenteraient une densité voisine de 1.31 (Roman-Gutierrez et al., 2003b), soit une densité légèrement plus faible que celle de l'amidon (*partie II.1*).

II.3. Les arabinoxylyanes

Les arabinoxylyanes (AX) sont les polysaccharides non amyliques majoritaires de la farine de blé (80% des polysaccharides), aux côtés des β -glucanes (15%) et des glucomannanes (5%) (Mares et Stone, 1973; Fincher et Stone, 1986). Ils proviennent essentiellement de la paroi des cellules de l'albumen amyliques et de la couche à aleurone (Posner, 2000; Surget et Barron, 2005). Ce sont des hétéropolymères constitués d'une chaîne linéaire de xylose associés par des liaisons β -(1-4), sur lesquels sont greffées des molécules d'arabinose (Gruppen et al., 1993) (Fig. 1.6).

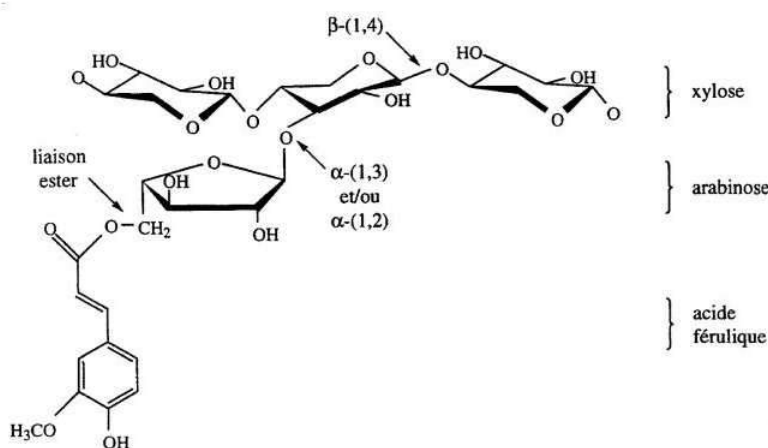


Fig. 1.6: Structure d'un arabinoxylyane

On subdivise les arabinoxylyanes en AX solubles (25% des AX) et en AX insolubles (75% des AX) en fonction de leur solubilité dans l'eau froide (Meuser et Suckow, 1986; Cleemput et al., 1993; Goesart et al., 2005). L'insolubilité des AX s'expliquerait par un poids moléculaire des AX insolubles (100-530 kDa) plus élevé que celui des AX solubles (20-120 kDa) et par un enchevêtrement des molécules plus important (Jelaca et Hlynka, 1971; Patil et al., 1975; Yeh et al., 1980; Fincher et Stone, 1986; Girhammar et Nair, 1992; Rattan et al., 1994; Dervilly et al., 2001). D'autre part, les arabinoxylyanes solubles peuvent se lier aux protéines du gluten par l'intermédiaire de l'acide férulique et des résidus tyrosyl et thiol des protéines (Neukom et Markwalder, 1978; Hosney et Faubion, 1981; Moore et Hosney, 1990) (Fig. 1.6).

Les AX solubles sont les molécules les plus hydrophiles de la farine de blé, avec une capacité d'absorption d'eau très variable allant de 4 à 10 g d'eau / g de matière sèche selon les

auteurs (Greer et Stewart, 1959; Bushuk, 1966; Jelaca et Hlynka, 1971; Kim et D'Appolonia, 1977). Ces AX solubles possèdent également une viscosité élevée en solution dans l'eau et sont en grande partie responsables de la viscosité d'un extrait aqueux de farine (Udy, 1956). Les AX insolubles sont également très hydrophiles et absorbent de l'ordre de 7-10 g d'eau / g de matière sèche (Bushuk, 1966; Jelaca et Hlynka, 1971).

II.4. Les lipides

Les lipides sont des constituants mineurs de la farine de blé qui peuvent être divisés en deux groupes (Eliasson et Larsson, 1993):

- les lipides polaires, qui peuvent interagir avec l'eau
- les lipides apolaires, qui n'interagissent pas avec l'eau

Cependant, le rôle des lipides dans les processus d'agglomération du gluten et du développement de la pâte n'a pas fait l'objet de recherches très poussées. Les recherches se sont en effet davantage focalisées sur les protéines du gluten pour déterminer leur organisation structurale au sein du gluten et leur rôle dans le développement de la pâte.

III. Le gluten: composition et structure

A proprement parlé, le gluten est un terme générique qui désigne l'extrait protéique insoluble obtenu après lixiviation, *i.e* lavage à l'eau, d'une pâte de farine de blé hydratée. Hors de ce contexte, il n'a pas de sens. Ainsi dans l'albumen, l'état d'interaction et la localisation des gliadines et des gluténines qui constituent le gluten reste encore mal connu. La lixiviation de la pâte permet d'entraîner l'amidon et les éléments solubles. Le gluten obtenu est principalement constitué de protéines (75-85% ms, essentiellement les gluténines et gliadines), mais il contient également de l'amidon (7-12% ms), des lipides (5-10% ms), des arabinoxylanes (2% ms) et des matières minérales (1% ms) (Wrigley et Bietz, 1988).

C'est Jacopo Beccari, en 1745, qui fut le premier à décrire le gluten comme un matériel visco-élastique obtenu par lixiviation d'une pâte de blé. Le terme visco-élastique fait référence au fait que le gluten présente une forte élasticité quand il est déformé mais s'écoule quand on le laisse au repos. Depuis Beccari (1745), de nombreux auteurs se sont intéressés à ce matériel, afin d'en déterminer la structure. On sait à présent que la formation du réseau de

gluten repose en partie sur la nature “polymérique” des gluténines et sur leur capacité à interagir avec les gliadines par des liaisons faibles. Les gluténines seraient responsables des propriétés élastiques, tandis que les gliadines seraient à l’origine des propriétés visqueuses (Dimler, 1963; Orth et Bushuk, 1972; Huebner et Wall, 1976; MacRitchie, 1980; Hamer et al., 1992; Pritchard et Brock, 1994). Toutefois, l’organisation structurale de ces deux fractions protéiques au sein du gluten reste toujours très spéculative (MacRitchie, 1999), pour la même raison que celle avancée pour la structure des polymères de gluténine qui composent le gluten, à savoir les méthodes de solubilisation dénaturantes. Aujourd’hui, deux modèles d’organisation du gluten s’opposent: le modèle polymérique et le modèle particulaire.

La théorie la plus courante, car la plus ancienne, concernant la structure du gluten est de considérer celui-ci comme un réseau continu de longs polymères de gluténine flexibles, qui serait stabilisé par des liaisons covalentes, non covalentes et/ou par des enchevêtrements topologiques selon les différents modèles proposés (Schofield, 1986; Belton, 1999; Shewry et al., 2001; Singh et MacRitchie, 2001).

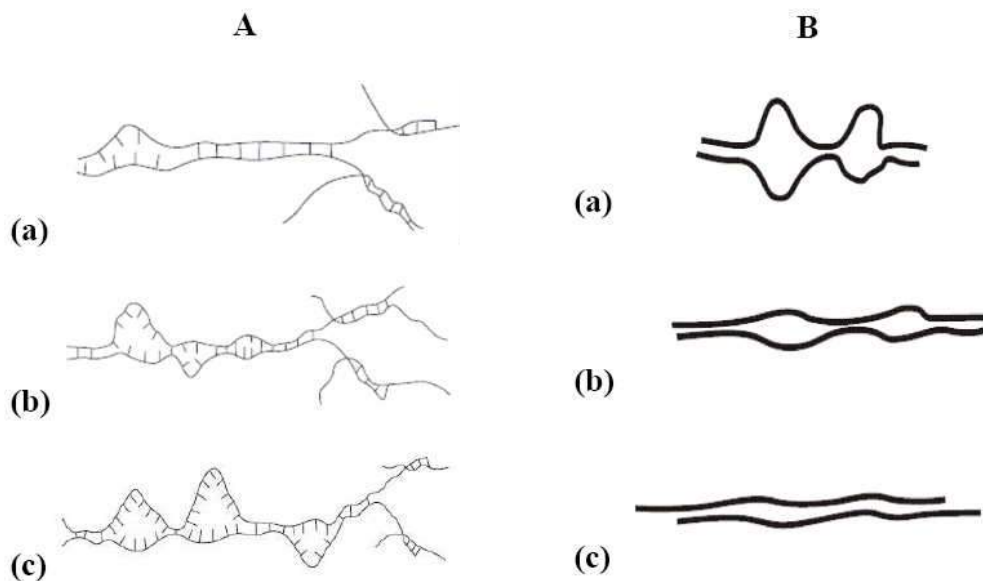


Fig. 1.7: Modèle “loop-and-train” proposé par Belton (1999) pour décrire la structure du gluten. **(A)** Effet schématique de l’hydratation des boucles et des chaînes et **(B)** Effet schématique de la déformation des boucles et des chaînes. **A:** (a) faible hydratation: liaisons hydrogènes principalement interchaînes, (b) hydratation intermédiaire: formation des boucles, (c) forte hydratation: équilibre entre boucles et chaînes. **B:** (a) pas de déformation: conformation à l’équilibre, (b) faible déformation: déformation des boucles, (c) forte déformation: allongement des boucles et glissement des chaînes de gluténine les unes sur les autres par rupture des liaisons hydrogènes.

Dans son modèle nommé “loop-and-train”, Belton (1999) propose que de très nombreuses liaisons hydrogènes permettraient de lier deux chaînes de gluténine (Fig. 1.7A). Cette densité de liaisons hydrogènes serait à l’origine du caractère élastique du gluten. En l’absence d’eau, les chaînes de gluténine auraient tendance à se lier les unes aux autres en une masse dense, les protéines étant peu structurées (Fig. 1.7Aa). Lors de son ajout, l’eau entrerait en compétition avec les liaisons hydrogènes situées entre les chaînes protéiques pour former des liaisons protéine-eau. Cependant, les liaisons hydrogènes interprotéiques seraient si nombreuses qu’il serait improbable qu’elles soient toutes rompues simultanément par l’action de l’eau. Des zones d’interaction entre les protéines demeurerait donc, définissant des chaînes liées (“trains”), tandis que les parties protéiques hydratées donneraient naissance à des boucles lâches (“loops”) dont le nombre augmenterait avec l’hydratation (Fig. 1.7Ab-c). Des liaisons disulfures permettraient, quant à elles, de lier successivement les chaînes de gluténine au niveau de leur extrémité terminale (Belton, 1999).

Selon l’intensité de la contrainte appliquée, les boucles se déformeraient en priorité jusqu’à s’allonger entièrement avant la rupture des liaisons hydrogènes, évènement qui provoquerait le glissement des chaînes les unes sur les autres (Fig. 1.7Ba-c). La relaxation de la structure se ferait par retour à l’équilibre des boucles et des chaînes (Belton, 1999). Le modèle “loop-and-train” repose donc sur un nombre d’interactions hydrogènes très élevé et sur la formation de longs polymères de gluténine par établissement de liaisons disulfures aux extrémités des chaînes. Par contre, ce modèle ne prend ni en compte les gliadines ni les autres constituants du gluten (amidon, AX, lipides).

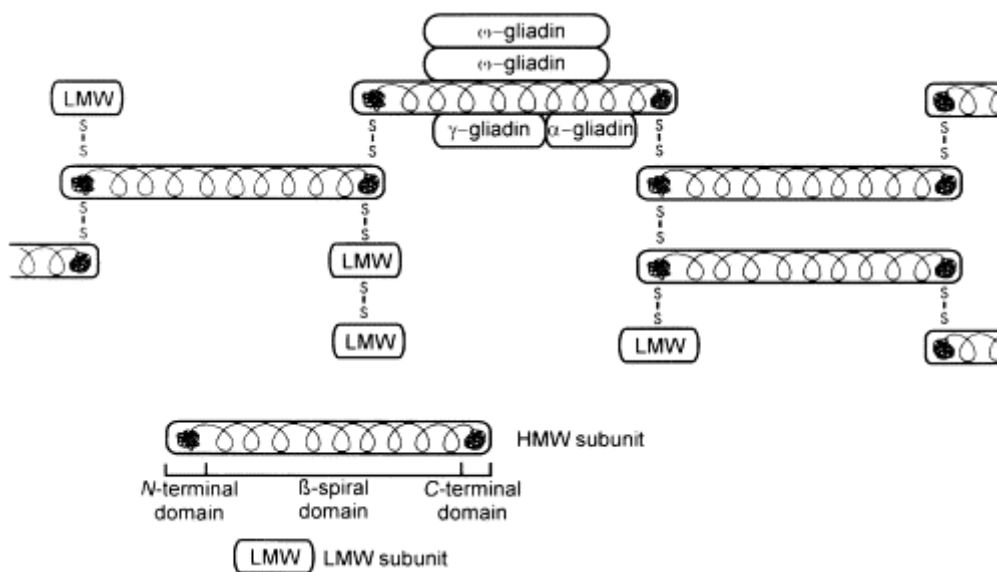


Fig. 1.8: Modèle de la structure du gluten proposé par Shewry et al., (2001).

Dans leur modèle moléculaire (Fig. 1.8), Shewry et al. (2001) suggèrent l'existence de ponts disulfures entre les polypeptides de HMW-GS et l'existence de liaisons non covalentes entre les gliadines et les polymères de gluténine. Le comportement à la déformation des polymères de gluténine est schématiquement présenté en Fig. 1.9. Dans ce modèle, les liaisons covalentes limiteraient la déformation car elles rigidifieraient la structure. Les gliadines, quant à elles, contribueraient à la création d'un environnement visqueux. Le déplacement des chaînes de HMW-GS ne serait alors permis que par le réarrangement des gliadines.

Un modèle polymérique légèrement différent de ceux proposés précédemment consiste à décrire le gluten comme un réseau continu de polymères flexibles enchevêtrés (Singh et MacRitchie, 2001). Dans ce modèle, la visco-élasticité s'expliquerait par le glissement des chaînes de polymères au niveau des enchevêtrements et la résistance à la déformation serait due à la présence de nombreux enchevêtrements et/ou nœuds de jonctions.

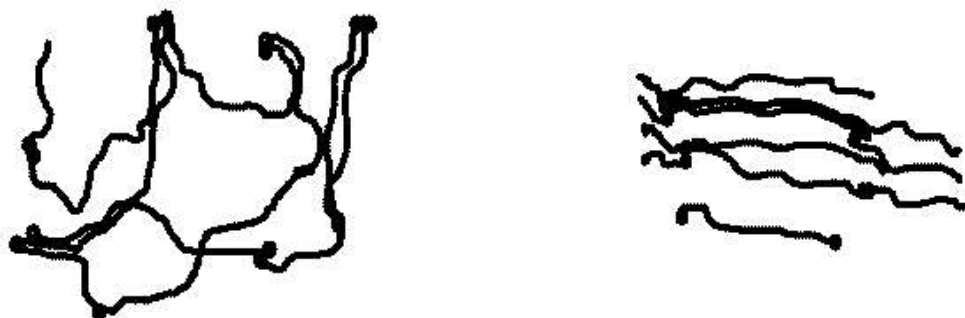


Fig. 1.9: Modèle de l'arrangement des HMW-GS au sein du réseau de gluten, avant (gauche) et après (droite) l'application d'une contrainte extensionnelle (Shewry *et al.*, 2001). Les ronds noirs représentent les ponts disulfures.

Pour Hamer et van Vliet (2000) et Lefebvre et al. (2003), le gluten ne peut absolument pas être considéré comme un réseau continu de polymères flexibles, mais plutôt comme un réseau de particules en étroites interactions. Hamer et van Vliet (2000) proposent par ailleurs un modèle d'organisation multi-échelle du gluten nommé "hyper-aggrégation". Ce modèle fait intervenir trois niveaux d'organisation (Fig. 1.10). Au premier niveau (nm- μ m), les HMW-GS et les LMW-GS sont liées entre elles par des ponts disulfures et forment ainsi des agrégats covalents. Au niveau supérieur ($< 100 \mu$ m), ces agrégats covalents forment de plus larges agrégats en s'associant entre eux par interactions physiques. A ce niveau, les agrégats sont stabilisés par des liaisons hydrogènes, des liaisons ioniques et des liaisons hydrophobes ou par l'établissement de ponts disulfures supplémentaires. La taille des agrégats formés est alors très dépendante du nombre et de la taille des agrégats covalents primaires de niveau 1.

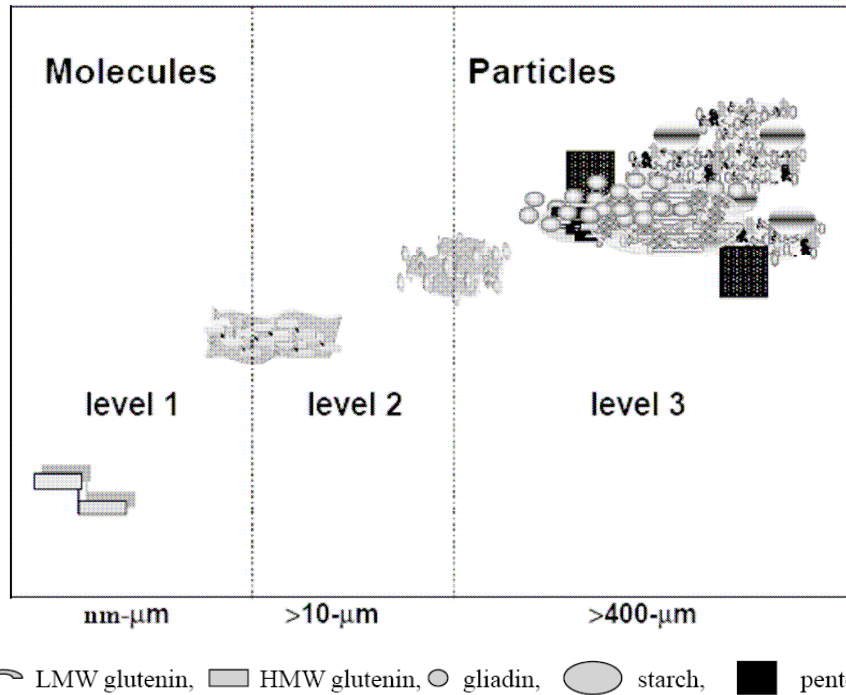


Fig. 1.10: Modèle “hyper-aggregation” proposé par Hamer et van Vliet (2000) pour décrire la structure du gluten.

Au troisième niveau d'organisation ($> 400 \mu\text{m}$), l'agrégation se poursuit par interactions physiques mais elle n'est plus stabilisée par des liaisons covalentes. A ce niveau d'organisation, la formation de tels agrégats est plutôt dépendante des conditions de pétrissage (cisaillement, contrainte) et de l'influence des autres polymères (lipides, AX, amidon) qui peuvent créer de nouvelles interactions physiques. Le modèle proposé par Hamer et van Vliet (2000) présente l'avantage d'intégrer à la fois les gluténines et les gliadines, mais aussi de prendre en compte les autres constituants piégés ou réellement associés au réseau de gluten, à savoir l'amidon et les AX. Selon les auteurs du modèle (van Vliet et Hamer, 2007), la visco-élasticité du gluten serait due aux nombreuses interactions interparticulaires se produisant aux différents niveaux de structure. Pour cela, les auteurs citent pour exemples d'autres fluides particuliers présentant également un comportement visco-élastique tels que la sauce tomate, les suspensions d'argile ou encore la mayonnaise.

Les tenants de la théorie particulaire et de la théorie polymérique s'opposent régulièrement dans le *Journal of Cereal Science* à coup de lettres polémiques envoyées à l'éditeur (Hamer et al., 2005; Belton et Dobraszczyk, 2006; Belton, 2007; MacRitchie, 2007; van Vliet et Hamer, 2007). Toutefois, tous les auteurs s'accordent à dire que les liaisons non covalentes joueraient un rôle important dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle

du réseau de gluten. La présence de telles liaisons est possible au regard de la composition en acides aminés des protéines du gluten (Tableau 1.1).

Tableau 1.1: Composition moyenne en acides aminés (%) des gluténines et des gliadines du blé (Ewart, 1967)

Acide aminé		Gluténines	Gliadines
polaire ionisé	Arginine (Arg, R)	4.1	2.7
	Lysine (Lys, K)	2.3	0.6
polaire non ionisé	Asparagine (Asn, N)	3.7	2.9
	Cystéine (Cys, C)	2.4	3.0
	Glutamine (Gln, Q)	33.1	38.9
	Histidine (His, H)	2.3	2.2
	Sérine (Ser, S)	5.4	4.7
	Thréonine (Thr, T)	3.1	2.2
	Tyrosine (Tyr, Y)	3.6	2.6
apolaire	Alanine (Ala, A)	2.8	2.0
	Glycine ou Glycocolle (Gly, G)	3.8	1.5
	Isoleucine (Ile, I)	3.7	4.3
	Leucine (Leu, L)	6.6	6.9
	Méthionine (Met, M)	1.7	1.4
	Phénylalanine (Phe, F)	4.8	5.5
	Proline (Pro, P)	10.3	13.8
	Tryptophane (Trp, W)	2.1	0.7
	Valine (Val, V)	4.2	4.1

Les gluténines et gliadines présentent en effet des teneurs en acides aminés ionisés particulièrement faibles (moins de 10%), ce qui implique une faible densité de charge sur toute la gamme de pH et donc de faibles forces de répulsion entre les protéines. Par conséquent, les chaînes protéiques peuvent interagir les unes avec les autres relativement facilement. De nombreuses liaisons hydrogènes peuvent se former via les nombreux résidus glutamine. Compte-tenu de la relative abondance d'acides aminés apolaires (40%), des interactions hydrophobes contribueraient également à la structure du réseau de gluten. Un très grand nombre d'interactions hydrogènes et hydrophobes serait possible par chaîne, à tel point que l'énergie nécessaire à la rupture de toutes ces liaisons secondaires serait bien supérieure à l'énergie d'une liaison covalente, d'où l'importance de leur rôle dans la cohésion intermoléculaire du réseau de gluten.

Le gluten est donc un matériel dont la structure, très complexe, reste aujourd'hui très mal connue. Pourtant, il n'est pas nécessaire de connaître sa structure dans le détail pour essayer de comprendre comment il se forme. Cette formation nécessite l'hydratation et le mélange énergétique des protéines et s'opère pendant l'opération de pétrissage (Belton, 2005).

IV. De la farine à la pâte: l'opération de pétrissage

Dans toutes les industries céréalières, les opérations de mélange de farine et d'eau constituent généralement la première étape du procédé et leur bonne conduite conditionne en partie la qualité des produits finis. La quantité d'eau ajoutée ainsi que l'action et la quantité d'énergie mécanique fournie lors de cette opération sont autant d'éléments critiques pour la structure du mélange et le développement du réseau de gluten. Les professionnels du secteur ont l'habitude de distinguer deux procédés de mélange, selon les conditions d'hydratation et la quantité d'énergie mécanique fournie: le malaxage et le pétrissage. Le malaxage, terme utilisé dans les industries pastières, permet d'obtenir une pâte granuleuse constituée d'agglomérats hydratés de particules de farine. Cela est possible par un mélange peu énergique de la farine de blé en présence de faibles quantités d'eau (30-35% de la masse de farine). Ce procédé ne permet généralement pas le développement du réseau de gluten (Matsuo et al., 1978; Dexter et Matsuo, 1979). Au contraire le pétrissage, terme utilisé en boulangerie, permet d'obtenir une pâte visco-élastique, lisse et homogène. Cela est possible avec un apport d'énergie modéré du fait de la présence de quantités d'eau plus élevées (50-60% de la masse de farine) (Bechtel et al., 1978; Parades-Lopez et Bushuk, 1983a,b; Bloksma, 1990). Un réseau protéique se développe au cours du pétrissage et se présente sous la forme d'un film continu de gluten entourant les grains d'amidon et retenant l'eau et les autres constituants de la farine (Bernardin et Kasarda, 1973a,b; Amend et Belitz, 1991). C'est l'établissement de cette structure si particulière qui confère à la pâte une grande visco-élasticité. Il est aujourd'hui clairement établi que le pétrissage est une opération unitaire critique sur l'ensemble du procédé de panification (Pomeranz, 1988; Bushuk et al., 1997). Toutefois, que connaissons-nous des mécanismes qui permettent la formation d'un tel réseau au cours du pétrissage ?

Trois éléments sont nécessaires pour former une pâte visco-élastique: de la farine, de l'eau et de l'énergie mécanique (Tipples et Kilborn, 1975). Selon ces auteurs, le pétrissage assure successivement trois opérations critiques au développement de la pâte: (i) la distribution et le mélange homogène des ingrédients et des constituants de la farine, (ii) l'hydratation des particules, notamment des protéines et (iii) le développement de la pâte grâce à l'énergie mécanique apportée par le pétrin.

L'hydratation des particules de la farine est généralement favorisée par l'opération de mélange qui augmente ainsi les probabilités de contact entre la farine et l'eau (Kilborn et Tipples, 1972; Tipples et Kilborn, 1975). Selon Tipples et Kilborn (1975), une hydratation suffisante des constituants de la farine est toutefois indispensable au développement de la pâte. Cette hydratation induit des changements de structure des protéines, caractérisés par l'enfouissement des zones hydrophobes et par la rupture et l'établissement de nombreuses liaisons faibles (ioniques et hydrogènes), mais induit également la solubilisation des protéines solubles du blé qui vont alors pouvoir contribuer à diverses réactions enzymatiques et/ou d'oxydo-réduction. Toutefois, le simple fait d'hydrater les constituants de la farine n'est pas suffisant pour développer la pâte (Campos et al., 1996, 1997); il faut également apporter de l'énergie mécanique.

L'apport d'énergie mécanique au cours du pétrissage permet le développement du réseau de gluten. Cet événement se traduit par une augmentation importante de l'élasticité, de la consistance et de la cohésion de la pâte (Gaines et al., 1988). Il peut être suivi par la mesure du couple s'exerçant sur le bras du pétrin (échelle laboratoire) ou par la mesure de la puissance électrique consommée (échelle industrielle). Parmi les pétrins de laboratoire instrumentés en capteur de couple, le farinograph et le mixograph sont les plus utilisés.

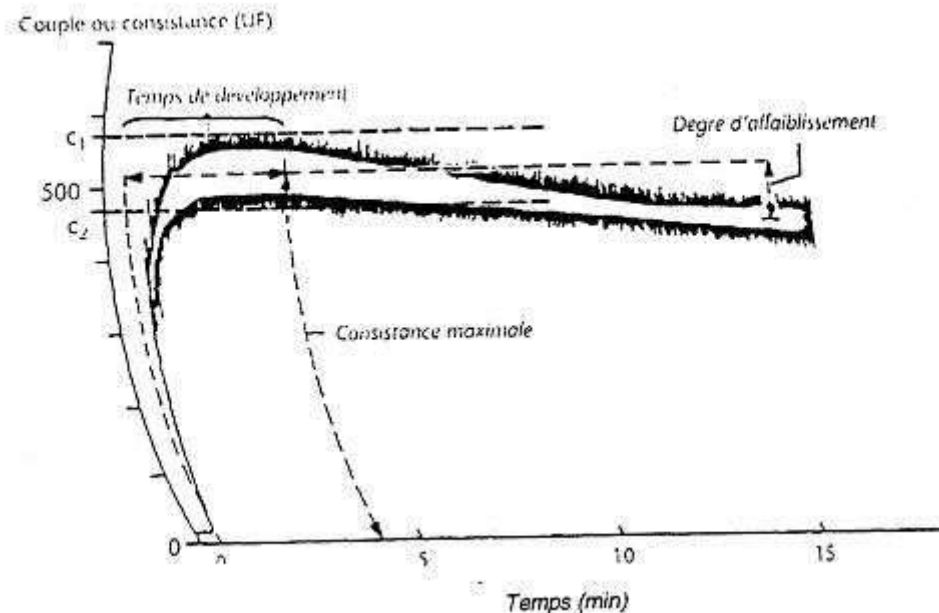


Fig. 1.11: Courbe de développement d'une pâte farine-eau obtenue à l'aide du farinograph Brabender (d'après Launay et Bartolucci, 1997).

Une courbe de farinograph classique, ou de mixograph également, permet de définir trois états de développement de la pâte (Fig. 1.11):

- **le sous-pétrissage**, quand le pétrissage est interrompu avant l'optimum de consistance. C'est durant cette étape que se forme le réseau de gluten.
- **l'optimum de pétrissage**, qui intervient quand la consistance de la pâte est maximale et stable. La pâte est alors formée du réseau tridimensionnel de filaments de gluten qui englobe tous les constituants de la pâte (Bernardin et Kasarda, 1973a,b; Amend et Belitz, 1991). Cet état assure la meilleure panification de la pâte, le réseau visco-élastique de gluten étant alors suffisamment développé pour retenir les bulles de gaz dégagées lors de la fermentation de la pâte.
- **le sur-pétrissage**, quand le pétrissage se poursuit au-delà de l'optimum. Cette étape se caractérise par une chute progressive de la consistance de la pâte. Elle rend cette dernière très collante et diminue fortement son élasticité et augmente sa plasticité (Markley et Bailey, 1939; Mani et al., 1992; Sai Manohar et Haridas Rao, 1992).

De très nombreux travaux ont montré que le développement de la pâte et ses propriétés rhéologiques dépendent des conditions de pétrissage (Fisher et al., 1949; Kilborn et Tipples, 1972; Endo et al., 1985):

- L'augmentation de la vitesse de pétrissage provoque une diminution du temps de développement de la pâte (Stamberg et Bailey, 1938; Kilborn et Tipples, 1972; Frazier et al., 1975; Baig et Hosney, 1977) et une augmentation de la consistance et de l'élasticité de la pâte (Bohn et Bailey, 1936; Hlynka, 1962; Frazier et al., 1975; Baltsavias et al., 1999).
- L'augmentation de la température de pétrissage se traduit généralement par une diminution du temps de développement de la pâte (Moore et Herman, 1942; Irvine et al., 1961; Hlynka, 1962; Dexter et Matsuo, 1979). Cependant, Baig et Hosney (1977) ont montré un effet inverse pour une augmentation de la température de pétrissage.
- L'augmentation de l'hydratation d'empatage entraîne une diminution de la consistance de la pâte et une augmentation de son temps de développement (Bohn et Bailey, 1936; Markley et Bailey, 1939; Merrit et Bailey, 1939; Anderson et Lancaster, 1957; Lancaster et Anderson, 1958; Dexter et Matsuo, 1979; Larsen et Greenwood, 1991).

Toutefois, ces très nombreuses observations, qui traduisent l'effet de tel ou tel paramètre du procédé sur le temps de développement optimal du réseau de gluten, n'ont pas permis aujourd'hui d'identifier quelles peuvent être les lois et les paramètres pertinents de l'opération de pétrissage qui président à la formation du réseau de gluten. La quantité d'énergie fournie à la pâte par le pétrin est souvent considérée comme un paramètre de contrôle du procédé de pétrissage (Chamberlain et al., 1967). Toutefois, la qualité de la pâte dépend souvent de la quantité d'énergie fournie et la quantité d'énergie nécessaire au développement optimal de la pâte dépend quasiment toujours de la géométrie du pétrin utilisé en laboratoire (Kilborn et Tipples, 1972; Skeggs, 1985; Wilson et al., 1997). La différence de quantité d'énergie nécessaire au développement de la pâte est encore plus importante sur des pétrins industriels, qui présentent des géométries de pétrissage très variables (Wilson et al., 1997). Outre la quantité d'énergie fournie, le type de déformation apporté par le pétrin est également un paramètre critique pour le développement de la pâte. Pour une même quantité d'énergie mécanique fournie, une pâte obtenue par cisaillement simple présente une structure et des propriétés rhéologiques très différentes de celles d'une pâte obtenue grâce à des sollicitations élongationnelles (Jongen et al., 2003). Au sein même des pétrins de laboratoire, farinograph et mixograph pour les plus courants (Fig 1.12), chaque pétrin apporte majoritairement un certain type de déformation. Selon Jongen et al. (2003), le farinograph apporte du cisaillement et de l'élongation, tandis que le mixograph apporte principalement du cisaillement. Toutefois, Gras et al. (2000) affirment que le mixograph apporte principalement de l'élongation.



Fig. 1.12: Géométrie des systèmes de pétrissage du farinograph (à gauche) et du mixograph (à droite).

Cette discussion montre que de nombreux paramètres du procédé de pétrissage, parfois difficiles à évaluer d'ailleurs, affectent la cinétique de développement du réseau de gluten ainsi que la qualité de la pâte. De plus, les effets de plusieurs paramètres sont souvent interconnectés (vitesse et énergie mécanique; énergie mécanique et hydratation) et il est difficile de les étudier spécifiquement. Cela explique certainement pourquoi aucune formalisation de la cinétique de développement de la pâte en fonction des paramètres du procédé de pétrissage n'a encore été proposée. De plus, dans le cas de la pâte à pain, toutes les étapes contribuant au développement optimal du réseau de gluten, à savoir l'homogénéisation des ingrédients, l'hydratation des constituants de la farine et l'apport d'énergie mécanique, se produisent de manière concomitante, et en seulement quelques minutes (5 min sur la Fig. 1.11). Pour cette raison, le système pâte à pain ne semble pas être le système le plus adapté pour étudier les mécanismes d'agglomération du gluten se produisant au cours du pétrissage. C'est pourtant le système le plus largement étudié dans la littérature, pour son intérêt en panification. Dans les années 50, Anderson et Lancaster (Anderson et Lancaster, 1957; Lancaster et Anderson, 1958) ont pourtant montré que la durée du sous-pétrissage peut être considérablement allongée en pétrissant des mélanges farine-eau beaucoup plus dilués (70-200% de la masse de farine). Ces travaux ont porté sur des pâtes diluées de type pâte à crêpe, ou "batters", et ont permis d'obtenir des temps de développement optimal de la pâte de l'ordre de 30-60 min. L'étude de tels systèmes, initiée à l'origine pour améliorer les procédés d'extraction du gluten dans les années 50, n'a toutefois pas été poursuivie dans la littérature, certainement en raison du faible intérêt des pâtes diluées dans les processus de panification. Ces études pourraient pourtant s'avérer utiles pour étudier les mécanismes d'agglomération du gluten se produisant au cours du pétrissage. De plus, le suivi des modifications protéiques se produisant au cours du pétrissage est un outil également pratique pour suivre l'agglomération du gluten par une voie plus physico-chimique, complémentaire de l'étude paramétrique présentée ci-dessus.

De très nombreux travaux se sont intéressés aux modifications biochimiques se produisant au cours du pétrissage de la pâte à pain. La modification de la distribution en taille des polymères de gluténine est parmi l'une des plus frappantes. Ainsi, la fraction de polymères de gluténine insolubles dans le SDS de la farine diminue continûment au cours du pétrissage et atteint une valeur minimale et quasiment nulle à l'optimum de développement (Weegels et al. 1995; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001; Don et al., 2003). Dans la littérature, cette fraction est nommée UPP (Unextractable Polymeric Protein) ou GMP (Glutenin Macro

Polymer) pour traduire un degré de polymérisation élevé (Graveland et al., 1982; Skerritt et al., 1999). Cette dépolymérisation du GMP n'est d'ailleurs pas un phénomène spontané, puisque l'interruption du pétrissage entraîne aussitôt sa reformation (Weegels et al., 1997; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001). De nombreuses corrélations positives ont été observées entre la quantité de GMP dans la farine et dans la pâte et la qualité du pain et des propriétés rhéologiques de la pâte (Dachkevitch et Autran, 1989; Gupta et al., 1992; Weegels et al., 1996). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la diminution du GMP au cours du pétrissage. Mecham et al. (1965) ou Tsen (1967) ont suggéré que la taille des polymères de gluténine diminue par séparation physique de ces polymères ou par rupture de liaisons non covalentes. D'autres auteurs évoquent plutôt une rupture des liaisons covalentes (Tanaka et Bushuk, 1973; MacRitchie, 1975; Graveland et al., 1980; Danno et Hoseney, 1982). Weegels et al. (1997), quant à eux, parlent tout simplement d'une dépolymérisation des polymères de gluténine de haut poids moléculaire. Les mécanismes impliqués sont d'autant plus difficiles à cerner que la structure du GMP et les liaisons qui assurent sa stabilité restent encore mal connues. De plus, aucune théorie ne permet d'expliquer en quoi la dissociation des polymères de gluténine les plus insolubles peut conduire à la formation du réseau tridimensionnel de gluten (Bot et de Bruijne, 2003).

V. Procédés d'extraction du gluten

Les procédés d'extraction du gluten de blé sont très nombreux et diversifiés (Kempf et Röhrmann, 1989; van der Borgh et al., 2005). L'extraction peut se faire à partir du grain de blé entier ou de la farine mais s'effectue toujours par voie humide, nécessitant de grandes quantités d'eau. L'extraction à partir du grain de blé libère beaucoup de fibres, issues des enveloppes du grain. Ces dernières sont rapidement emprisonnées au sein du réseau de gluten et en gênent la continuité. Ceci conduit à une diminution du rendement d'extraction et de la pureté du gluten (Meuser et al., 1989). Par conséquent, les procédés d'extraction les plus couramment relevés dans l'industrie utilisent la farine comme matière première. Parmi ces procédés, trois d'entre eux sont les plus largement utilisés: le procédé Martin, le procédé "batter", et le procédé "dough-batter". Comme tout procédé de fractionnement, ces derniers se basent sur les différences physico-chimiques majeures entre l'amidon et les protéines du gluten, à savoir la taille, la solubilité, la densité et la forte capacité d'agglomération des protéines (*cf partie II*).

Le procédé Martin, développé industriellement en 1835, est sans doute le plus ancien procédé d'extraction industriel. La farine et l'eau (40-60% de la masse de farine) sont mélangées rapidement pour former une pâte uniforme et consistante, de type pâte à pain (Fellers, 1973; Godon et al., 1983; Knight et Olson, 1984). Cette pâte est alors laissée au repos, pour assurer une bonne hydratation et renforcer le gluten selon les auteurs. Godon et al. (1983) ont observé que ce repos permettait d'augmenter le rendement d'extraction du gluten sans altérer sa teneur en protéines. Puis la pâte est lavée par ajout d'eau supplémentaire tout en assurant un malaxage délicat de la pâte afin d'expulser l'amidon. La pâte se concentre alors en protéines jusqu'à l'obtention du gluten. Le gluten est alors séché de façon modérée (température inférieure à 70°C) pour qu'il conserve toutes ses propriétés visco-élastiques. On parle alors de gluten vital.

Dans le procédé "batter", la farine est mélangée avec une quantité d'eau plus élevée (70-200% de la masse de farine) de façon à former une pâte liquide, de type pâte à crêpe ou "batter". Cette pâte est pétrie jusqu'à former une pâte visco-élastique, caractéristique du développement optimal du réseau de gluten (Hilbert et al., 1944; Rist, 1949; Anderson et al., 1958, 1960). La pâte est ensuite déstructurée par un lavage intensif en présence d'eau additionnelle, de façon à produire des agrégats de gluten en suspension dans l'eau (Anderson et al., 1958). Finalement, le gluten est récupéré par centrifugation, par tamisage ou par décantation (Anderson et al., 1958, 1960; Fellers, 1973; Meuser et al., 1989; Sindic et al., 1993). Le gluten est alors séché de façon modérée pour obtenir du gluten vital. Il existe également de nombreux dérivés du procédé "batter". On peut citer les procédés Fesca ou Raisio qui se distinguent du procédé "batter" par la phase de pétrissage, celle-ci étant beaucoup plus rapide et ne permettant pas d'obtenir une pâte visco-élastique (Johnston and Fellers, 1971; Fellers, 1973; Knight et Olson, 1984).

Le dernier procédé présenté est le procédé "dough-batter" qui est un compromis entre le procédé Martin et le procédé "batter". Ce procédé commence par un mélange de la farine avec une faible quantité d'eau (40-60% de la masse de farine) de façon à former une pâte consistante de type pâte à pain. De l'eau est ensuite ajoutée, de façon à se placer dans le domaine d'hydratation du procédé "batter" (70-200% de la masse de farine). La pâte, initialement consistante, est alors pétrie avec l'eau pour former une pâte diluée de type pâte à crêpe (Hamer et al., 1989; Sindic et al., 1993, Roels et al., 1998; Frederix et al., 2004). Le

lavage de la pâte et la séparation du gluten sont ensuite effectués de la même façon que le procédé “batter”.

De façon générale, tous les procédés s’effectuent donc en trois étapes: le pétrissage, le lavage et la séparation finale du gluten et de l’amidon. Le pétrissage est une opération unitaire tout aussi critique dans le procédé amidonnier que dans le procédé boulanger car le développement du réseau de gluten peut être favorisé ou non pendant cette opération. Toutefois, l’agglomération du gluten peut également se poursuivre pendant la phase de lavage si celle-ci reste très cisailante. Aujourd’hui, il est impossible de connaître l’influence de chaque opération unitaire sur le degré d’agglomération du gluten. Tous les procédés ont été établis de façon très empirique et sont devenus très complexes au cours du temps. Il suffit de varier la conduite d’une seule opération pour affecter l’ensemble du procédé. Etudier l’influence spécifique de la phase de pétrissage sur l’agglomération du gluten reste par conséquent difficile à évaluer industriellement. Et ce n’est pas la multitude des procédés d’extraction et le secret professionnel qui prévaut dans cette industrie qui permettent de clarifier la situation. Cette connaissance très empirique du procédé a toutefois ses limites dès qu’il s’agit de modifier en profondeur le procédé pour réduire la consommation d’eau par exemple, ou pour construire un nouveau site industriel.

VI. Méthodologie retenue pour l’étude

Le pétrissage est une opération unitaire fondamentale pour les boulangers et les amidonniers. Il assure la formation d’un réseau percolant constitué des protéines visco-élastiques du gluten au sein de la pâte. Toutefois, les mécanismes physiques et chimiques responsables de l’apparition de cette structure restent encore mal cernés et les lois qui président à cette agglomération ne sont actuellement pas connues. Cette problématique majeure constitue l’enjeu de ce travail de thèse.

Notre approche méthodologique s’inscrit dans la continuité des études déjà menées sur le pétrissage de la pâte boulangère et résumées dans la synthèse bibliographique. Elle fait globalement appel aux mêmes outils, combinant un suivi des changements rhéologiques de la pâte au cours du pétrissage avec un examen des modifications biochimiques impliquant les protéines du gluten. Elle s’en démarque aussi fondamentalement puisque la teneur en eau de

la pâte y fera l'objet d'une investigation systématique, et cela en dehors de la plage d'hydratation de la pâte boulangère.

Avec les pâtes diluées de type "batter", le temps de pétrissage nécessaire à l'agglomération totale du gluten est considérablement rallongé. La question de savoir comment la vitesse de pétrissage et l'hydratation des pâtes contribuent à la cinétique de développement du réseau de gluten sera le point de départ de notre étude.

L'extraction du gluten est envisageable à partir d'une suspension farine-eau diluée, qu'elle soit développée de façon optimale ou non. L'évolution du rendement d'extraction et de la composition protéique du gluten en aval de l'opération de pétrissage n'a cependant jamais fait l'objet d'une étude paramétrique systématique. Ceci constituera donc le deuxième volet de nos investigations. Pour cela, nous allons standardiser l'étape de lixiviation de la pâte de façon à minimiser son impact sur l'agglomération des protéines. Nous pousserons l'étude jusqu'à l'analyse biochimique et rhéologique des glutens extraits. Il nous sera alors possible de cerner l'influence des paramètres du pétrissage sur la physico-chimie des protéines du gluten. Le procédé d'extraction du gluten utilisé dans cette étude est présenté dans la Fig. 1.13 et sera détaillé dans les différents chapitres du manuscrit. Le pétrissage et le lavage de la pâte seront effectués dans un pétrin P600 (Brabender OHG, Allemagne), lui-même connecté à un Plastograph (Brabender OHG, Allemagne) qui enregistre le couple, la température et la vitesse de pétrissage. Le capteur de température est situé au fond du bol, en contact avec la pâte.



Fig. 1.13: Photos du procédé d'extraction du gluten utilisé dans cette étude: (gauche) pale hélicoïdale de pétrissage montée sur le bol P600 de Brabender, (centre) pale en K de lavage et (droite) tamiseuse automatique en voie humide.

Le pétrissage sera effectué par une pale hélicoïdale, tandis que le lavage sera effectué par une pale en K. La suspension gluten-amidon issue du lavage sera ensuite transférée sur trois tamis de maillage 800-400-200 μm et le gluten sera récupéré sur les tamis par voie humide.

La réalisation des deux objectifs énoncés précédemment nous conduira à poser le problème du développement du réseau de gluten dans les mélanges farine-eau dilués en des termes phénoménologiques. Pour tenter d'y voir plus clair, nous visualiserons l'agglomération du gluten se produisant au cours du pétrissage par une technique de marquage des protéines et d'analyse d'images adaptée à l'échelle des phénomènes mis en jeu (grossissement x5).

Enfin, dans la synthèse générale de cet ouvrage, nous tenterons de dégager les mécanismes qui relient l'évolution physico-chimique des protéines du gluten au cours du pétrissage à la structuration d'un réseau de gluten percolant à caractère visco-élastique.

CHAPITRE 2

ÉTUDE PARAMÉTRIQUE DE L'OPÉRATION DE PÉTRISSAGE SUR LE DÉVELOPPEMENT OPTIMAL DU RÉSEAU DE GLUTEN

Chapitre 2A – Influence de l’hydratation et de la vitesse de pétrissage sur le développement optimal du réseau de gluten

OBJECTIF

L’objectif de ce premier chapitre est d’étudier l’influence de la vitesse de pétrissage et de l’hydratation d’empatage sur la courbe de développement des pâtes diluées obtenues avec le pétrin P600. Plus précisément, il s’agit de prédire le temps de pétrissage nécessaire au développement optimal du gluten en fonction des paramètres du procédé, et de connaître ainsi quelle(s) variable(s) paramétrique(s) contrôle(nt) l’agglomération maximale du gluten. Cette étude porte sur trois variétés de blé tendre pour s’assurer de la représentativité des résultats obtenus et voir dans quelle mesure pourraient s’exprimer les différences variétales.

Cette étude a également l’objectif d’introduire l’utilisation de suspensions farine-eau diluées, dites “batters”, dans l’étude du contrôle de l’agglomération des protéines du gluten se produisant au cours du pétrissage. Dans cet esprit, la microstructure d’une pâte diluée sera présentée, pour exemple, au cours du pétrissage par coloration spécifique des protéines. Il s’agit d’avoir une vision claire de ce qu’est une pâte diluée et d’appréhender sa structure ainsi que celle des protéines qui la composent à une échelle d’observation assez large.

Publication n°1 - A parametric and microstructural study of the formation of gluten network in mixed flour-water batter*

Abstract

The mechanism of gluten network development is still unclear and remains difficult to study since gluten network formation in bread dough is a rather quick process. In order to better characterize this dynamic event, we slowed down its kinetics by increasing the dough water content. During mixing, performed with a planetary mixer at variable mixing speeds and flour/water ratios, the torque was recorded. Common flours from wheat cultivars Orvantis, Caphorn and Isengrain, similar in composition and Farinograph parameters, were studied. At low flour/water ratios, mixing curves showed a lag phase preceding the increase of torque to the maximum dough resistance peak. Lag phase duration increased with dough water content, whereas increasing the mixing speed decreased time for optimal dough development. For the three flours studied, the time for optimal dough development was found to be related to the instantaneous power delivered to the dough during the lag phase and not to the specific mechanical energy required to get the maximum torque. Besides the effect of this common control parameter, flours exhibited wide variations in response to a given instantaneous power delivery, with dough development times varying by a factor of 6. Orvantis was always faster to develop than Caphorn or Isengrain. Optical microscopy observations of batters, using a protein stain, showed that gluten network development resulted from two successive phenomena. The first one involved the formation of microscopic gluten lumps, and the second one consisted of the development of gluten strands starting at the end of the lag phase. The very different behaviours observed for the three flours are discussed in relation to the batter structure and to the colloidal properties of gluten proteins.

*Auger, F., Morel, M.H., Lefebvre, J., Dewilde, M., Redl, A., 2007. **Journal of Cereal Science**, doi: 10.1016/j.jcs.2007.10.006. *In Press*.

I. Introduction

Dough development is a dynamic process occurring during the mixing of flour-water blends. It is related to the formation of a three-dimensional network of the unique viscoelastic gluten proteins (Shewry et al., 2003). As recently reviewed by Belton (2005), dough development results from hydration of flour components and structural changes due to mechanical mixing.

Hydration depresses the glass transition temperature of gluten and authorizes full mobility of protein chains at ambient temperature (Cuq et al., 2003). As demonstrated from flour and ice blending experiments, hydration alone cannot account for the formation of a protein matrix within the dough (Campos et al., 1996, 1997). Mechanical mixing homogenizes the distribution of flour constituents and ensures the building of intermolecular associations between gluten proteins. Mixing imparts the energy needed to develop gluten into small elastic fibrils that progressively expand within the dough mass. Specific mechanical energy (SME) input is currently accepted as the key parameter insuring optimal bread dough development. In the Chorleywood Bread Process, a SME of ca. 40 kJ/kg is suitable for a wide range of flour types and SME can be used as an integral parameter for the evaluation of the mixing process. Nevertheless, the rate at which energy is delivered is also important and low mixing speeds (below 50 rpm) should be avoided in order to get the best results (Chamberlain et al., 1967). In rheological terms, the existence of a threshold shear rate might suggest that some viscous or plastic deformation is needed in order to get the optimal spanning of the dough mass by the gluten network.

Not only the quantity of mechanical energy input, but also the nature of the mixing action is important for dough development. In industrial mixers, but also in Farinograph and Mixograph, computational fluid dynamics simulations showed that three types of motions are at play : (1) pure extensional flows leading to material deformation, (2) pure shear leading to viscous flow, and (3) rigid body motions (rotation) with no impact in terms of deformation (Jongen et al., 2003). According to Lee et al. (2001), a combination of shear and extensional deformation would be needed to ensure full gluten network development. Attempts have been made to develop a dough using simple steady shear. For this purpose, Peighambardoust et al. (2004) developed an original device in which slippage during steady shear test could be avoided. With this device (Peighambardoust et al., 2006b), they observed the formation of a gluten matrix consisting of interconnected gluten patches. A similar structure was obtained for dough developed with a z-blade mixer, which involves both shear and elongational flows.

Nevertheless, they showed that the large protein patches remained stable under simple shearing whereas they disappeared in the z-blade mixer. They concluded that the process tolerance of the sheared dough is due to the lack of steady elongational flow responsible for the break-up of large aggregates.

Understanding dough processing and gluten development at a mechanistic level is still a real challenge. This is not only due to the complicated nature of the mixing process reported above. Actually, most of the published data on dough mixing concerns typical bread dough formulations with dough water contents close to the Farinograph absorption (55-65%). At this level of hydration, gluten network development occurs in less than 10 min. In practice, protein hydration and structural changes are highly interconnected and should proceed in parallel during bread dough mixing. The shear stress and the distributing action of mixing favour hydration of flour components by forcing both phases into contact. So, at this level of dough water content, the respective roles of hydration and mechanical input remain rather confused due to their concomitance.

In order to disclose the effect of protein hydration and mechanical mixing on gluten network development, we decided to study the mechanical development of highly hydrated doughs, referred to as batters. In the late 50s, Anderson and Lancaster (Anderson and Lancaster, 1957; Lancaster and Anderson, 1958) performed interesting studies on the mixing behaviour of batters and showed that increasing the dough water content far beyond the Farinograph absorption considerably delayed the dough development. In such batters, we may suppose that hydration of flour proteins could be achieved rapidly and be more disconnected from the structuring impact of mechanical mixing. Unfortunately, since their pioneering works, little attention was paid to batters. In the present work, we study the effects of flour/water ratio and mixing speed on batter development from a mechanistic point of view. The development of a gluten network during dough mixing is also followed at the microscopic scale by using a specific protein stain.

II. Experimental

II.1. Flours

French commercial wheat grains (cvs. Orvantis, Caphorn and Isengrain, harvest 2004) were milled on a Bühler laboratory mill (MLU 202, Bühler, Switzerland) according to AACC (2000) method 26-31. Moisture and ash contents were determined according to AACC

methods (44-15A and 08-01, respectively). A Brabender Farinograph with a 50-g flour sample was used according to AACC method 54-21 to determine Farinograph water absorption and mixing time. A Chopin Alveograph with a 250-g flour sample was used according to ICC Standard method No. 121 to determine W and P/L ratio (IACST, 1992). The protein content ($N \times 5.7$) was determined using the Kjeldahl method. Soluble (WEAX) and total arabinoxylan contents were determined as described by Rouau and Surget (1994).

II.2. Dough formulation and mixing characteristics

Flour-water blends were mixed at 25°C using a planetary mixer bowl P600 (Brabender OHG, Germany) equipped with a dough hook and thermostated with a water double jacket. The mixer was coupled to a Plastograph lab-station (Brabender OHG, Germany) which allows continuous torque, speed and temperature recording. Total dough mass was 550g and all ingredients were equilibrated at 25°C before mixing.

Routinely, flour was added to the water and premixed during 1 min at 28 rpm. After the premixing step, the mixer was stopped during exactly 1 min 30 s in order to gather the dough in the middle of the bowl. This premixing phase (2 min 30 s) will not be presented and was not considered for mixing time or mixing energy evaluations. Mixing was restarted at 80, 90 or 100 rpm until the torque reached its maximum level at the time for optimal dough development, referred to below as t_{peak} . Three levels of mixing speed (80, 90 and 100 rpm) and flour/water ratio [(1.04-1.09-1.14, wb) for Orvantis, (1.11-1.18-1.25, wb) for Caphorn and (1.30-1.34-1.39, wb) for Isengrain] were tested. Flour/water ratios (F/W ratios) were chosen on the basis of preliminary experiments in order to obtain, for the three flours, the same range of minimum torque levels (from 1 to 3 N.m), referred to below as baseline torque (Γ_b). From triplicate runs of the central condition (90 rpm, medium F/W ratio), standard deviations of t_{peak} and Γ_b were found to be less than 10% and 5%, respectively.

Total specific mechanical energy (SME) imparted to the optimally developed dough was calculated from torque/speed data according to Eq. (1):

$$SME = \frac{\omega}{M} \int_0^{t_{peak}} \Gamma(t) dt = \frac{2\pi N}{M 60} \int_0^{t_{peak}} \Gamma(t) dt \quad (1)$$

where N and ω are the mixing speed (in rpm and rad.s^{-1} , respectively), M the dough mass (kg), $\Gamma(t)$ the torque (N.m) at time t and t_{peak} the mixing time (s) needed to reach the maximum torque. SME is expressed in J/kg.

II.3. In situ protein staining and dough observation

Evolution of the protein phase distribution was studied during mixing using Fast Green (Sigma, Germany) as a specific stain. Typically, 0.896 mg of stain per g of protein was added to dough water. We checked that addition of Fast Green did not alter dough development time or torque level. Dough sampling was performed at regular intervals during a stop of exactly 30 s. The procedure did not lead to any significant change, except the t_{peak} value, which was delayed by a few minutes because of the sampling stops. Dough was sampled using a spoon while taking care not to disturb its surface. The dough sample was deposited on a rigid plastic sheet. Two spacers of 1.5 mm were placed on both sides of the dough layer and another rigid plastic sheet was tapped onto its surface with gentle pressure to smooth the surface. A Canon EOS 20D numeric camera (Canon, Japan) equipped with a 105 mm macro lens (Canon, Japan) was used to take pictures of dough samples. Natural lighting (5200 K) was provided by two fluorescent lamps (TC-L36W, Osram Dulux, Italy).

III. Results

III.1. Flour characteristics

Extraction rates, biochemical and technological characteristics of the flours are given in Table 2A.1. Extraction rate, ash and protein contents were very similar. Arabinoxylan contents varied slightly, being less for Isengrain. Farinograph water absorptions and mixing times were typical of standard breadmaking flours. With regards to the viscoelastic behaviours, Caphorn gave stronger dough than Orvantis and Isengrain, which showed similar extensibility (P/L ratio) and strength (W).

Table 2A.1. Flour characteristics

Wheat cultivar	Extraction rate (%)	Ash (% db)	Dry matter (%)	Protein (% db)	WEAX (% db)	Total AX (% db)	WA ^a (% wb)	MT ^a (min)	W ^b (10 ⁻⁴ J)	P/L ^b
Orvantis	71.08	0.41	85.35	10.75	0.58	2.33	58.0	1.9	227	0.97
Caphorn	71.69	0.46	84.73	10.32	0.62	2.16	57.8	1.9	309	1.77
Isengrain	72.92	0.44	85.16	10.09	0.35	1.80	55.6	1.7	217	1.10

^a Farinograph parameters: WA = water absorption, 14% water basis; MT = mixing time

^b Chopin Alveograph parameters: W = dough deformation work; P/L = dough tenacity/extensibility ratio

III.2. Typical flour-water batter mixing curves from Orvantis, Caphorn and Isengrain

Mixing curves are given in Fig. 2A.1a-f. Three successive mixing phases were typically observed for a flour-water batter:

- 1) First, a continuous decrease of the torque by 2 or 3 N.m just after the onset of hook motion. This phase corresponds to the time needed to reach the steady state shear regime and could be related to a thixotropic behaviour of the batter. Indeed, during this first phase, stress relaxation was observed in response to a mixing stop, while restarting of the mixing led to a stress overshoot (not shown).
- 2) A lag phase where the torque is minimum and remains fairly constant for variable lapses of time. This torque is referred to below as the baseline torque (F_b). During this phase, the dough mass always looked like a thick suspension adhering to the bowl wall and no thixotropic behaviour was detected upon stopping or restarting the mixing.
- 3) A sudden and progressive torque rise to a maximum, reached after mixing time = t_{peak} . During torque increase, the dough mass wrapped around the hook and the whole of it was carried by the hook at t_{peak} , with little adherence to the bowl. Further mixing led to a torque decrease as dough collapsed.

In order to get comparable baseline torques (1 - 3 N.m), Orvantis was shown to require more water ($1.04 < F/W$ ratio < 1.14) than Caphorn ($1.11 < F/W$ ratio < 1.25) and Isengrain ($1.30 < F/W$ ratio < 1.39). In the range of F/W ratios studied, the effect of mixing speed was similar for the three flours (Fig. 2A.1a-c): t_{peak} decreased as mixing speed increased from 80 to 100 rpm. For the three flours, a decrease in F/W ratio caused a decrease in baseline torque (i.e. dough consistency) and an increase in t_{peak} values (Fig. 2A.1d-f). Mixed at similar baseline consistencies, the three flours showed very contrasted t_{peak} values (Fig. 2A.1d-f). For instance, at 90 rpm and baseline torque of ca. 1.3 N.m, dough development of Orvantis was faster ($t_{peak} \sim 10$ min) than Caphorn ($t_{peak} \sim 70$ min) and Isengrain ($t_{peak} \sim 100$ min). This result strongly contrasts with the rather similar Farinograph mixing times obtained with standard Farinograph mixing conditions (Table 2A.1). The very contrasted t_{peak} values observed for cultivars Orvantis, Caphorn and Isengrain mixed as batters explain our selection of these varieties from a larger lot of cultivars.

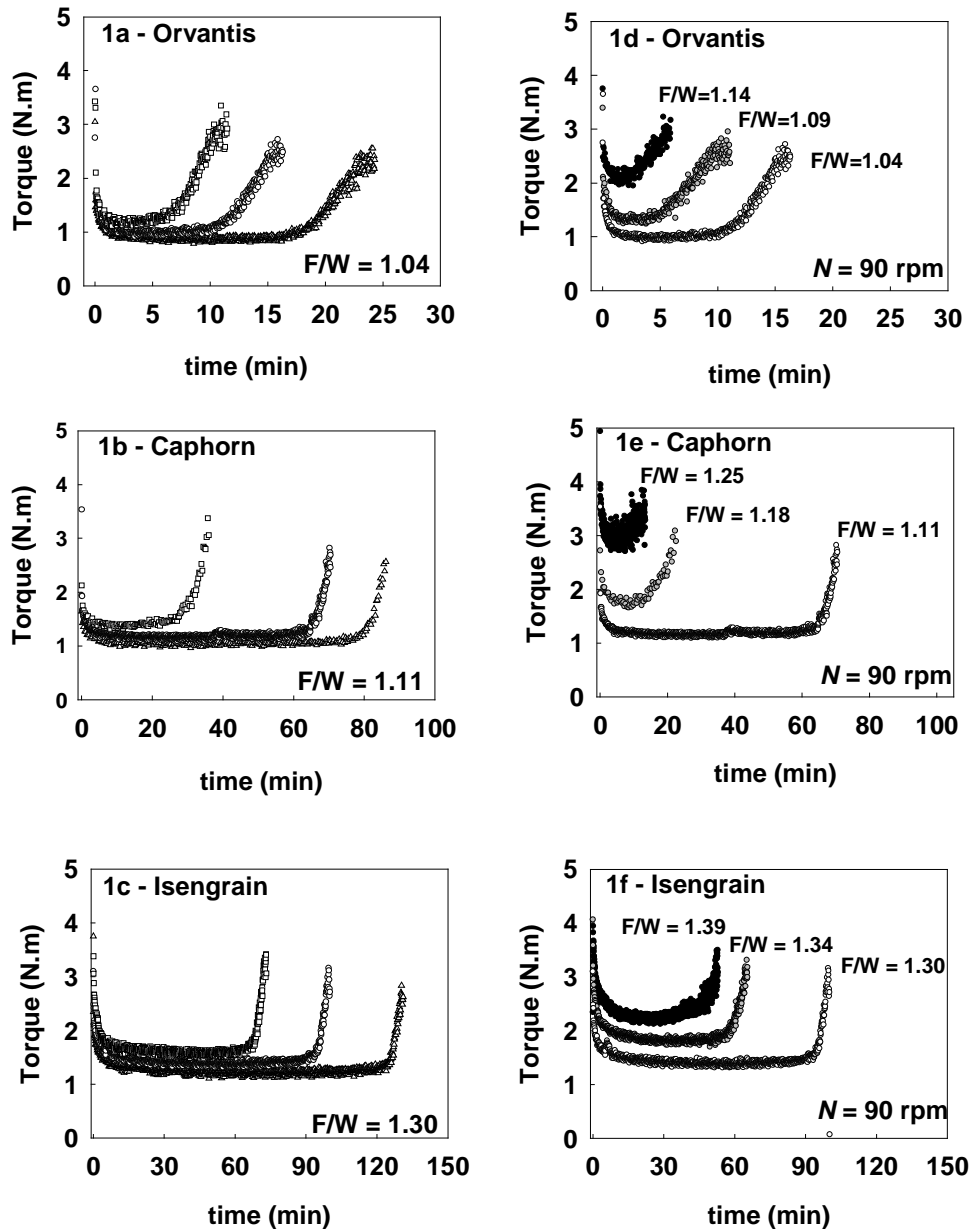


Fig. 2A.1. (a-f) Effect of mixing speed (N) and flour/water ratio (F/W) on dough development curves obtained at 25°C. (a-c) Effect of mixing speed; (\square) 100 rpm, (\circ) 90 rpm and (\triangle) 80 rpm. (d-f) Effect of F/W ratio; (closed symbols) high F/W ratio, (grey symbols) medium F/W ratio, (open symbols) low F/W ratio.

III.3. Effect of mixing speed on baseline torque and peak development time

The effect of mixing speed on development curves is shown in Fig 2A.1a-c for the lowest F/W ratios. Increasing the mixing speed slightly increases the baseline torque Γ_b . Considering that mixing torque (Γ) and mixing speed (N) are, respectively, related to shear

stress (σ) and shear rate ($\dot{\gamma}$), the apparent baseline viscosity of the batter (η_b) could be estimated from the following classical equivalent relationships:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \Rightarrow \quad \Gamma_b = \eta_b \cdot N \quad (2)$$

where Γ_b is the baseline torque (N.m) measured during the lag phase, η_b is the apparent baseline viscosity (Pa.s \sim N.m.rpm⁻¹ in our approximation) and N is the mixing speed (rpm).

In Table 2A.2, the apparent baseline viscosity $\eta_b = \Gamma_b/N$ is shown for all the experiments. For a same flour and F/W ratio, rather similar estimates of η_b were obtained irrespective of the mixing speed, strongly suggesting that during the lag phase, all flour-water batters can be considered as Newtonian fluids in the limited range of mixing speeds studied.

Table 2A.2. Estimation of baseline viscosity (η_b) from baseline torque (Γ_b) measurements at 25°C.

Flour	F/W ratio	η_b^a (10 ⁻² N.m/rpm)			Average η_b (10 ⁻² N.m/rpm)
		80 rpm	90 rpm	100 rpm	
Orvantis	1.14	2.38	2.30	2.43	2.37 ± 0.07
	1.09	1.62	1.66	1.72	1.67 ± 0.05
	1.04	1.10	1.10	1.18	1.13 ± 0.05
Caphorn	1.25	2.70	3.17	3.06	2.98 ± 0.24
	1.18	2.00	2.00	2.14	2.05 ± 0.08
	1.11	1.28	1.28	1.37	1.31 ± 0.05
Isengrain	1.39	2.64	2.46	2.92	2.67 ± 0.23
	1.34	2.04	1.99	2.00	2.10 ± 0.03
	1.30	1.50	1.51	1.56	1.52 ± 0.03

^a $\eta_b = \Gamma_b/N$, N is the mixing speed

Fig. 2A.1a-c showed that the higher the rotation speed was, the faster dough development proceeded. Logically, we found the mixing time t_{peak} to be inversely related to mixing speed. For the sake of comparison, t_{peak} values obtained at a given F/W ratio were normalised by the corresponding value obtained at 80 rpm (normalised $t_{peak} = t_{peak} / t_{peak [80rpm]}$). Fig. 2A.2 shows, for the three flours, a reciprocal plot of these normalised t_{peak} values as a function of the mixing speed N .

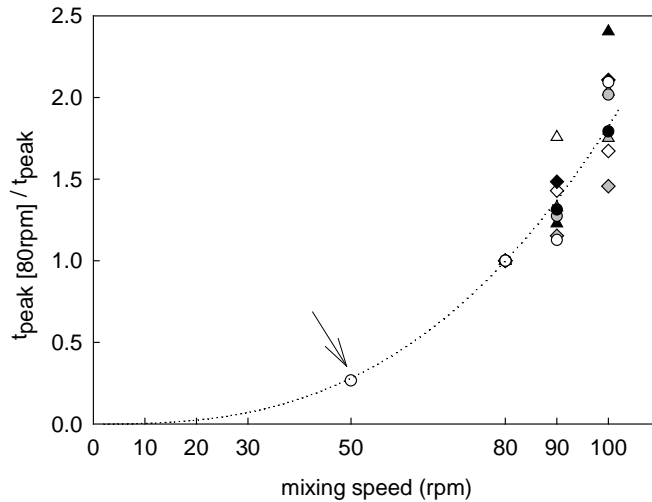


Fig. 2A.2. Effect of mixing speed on the inverse of normalised time for dough development ($t_{peak}/t_{peak[80rpm]}$). Results from (\diamond) Orvantis, (Δ) Caphorn and (\circ) Isengrain mixed at 25°C. Flour/water (F/W) ratios as in Fig. 2A.1d-f; (closed symbols) high F/W ratio, (grey symbols) medium F/W ratio, (open symbols) low F/W ratio. Arrow indicates extra experiment made with Isengrain (50 rpm, F/W ratio = 1.39 and 25°C). Dotted line is regression plots of dough Isengrain (F/W ratio = 1.39) according to a power law relation.

Despite the small number of mixing speeds investigated and the data scatter related to the different flour behaviours, the results reported in Fig. 2A.2 suggest that t_{peak} would not decrease linearly with mixing speed in the range of 0-100 rpm. This observation is substantiated by an extra experiment performed at 50 rpm with the flour Isengrain ($F/W = 1.39$); the arrow in Fig. 2A.2 shows the corresponding point. The inverse of normalised t_{peak} values could be related to the mixing speed according to a power law relationship $t_{peak}[80rpm]/t_{peak} = \alpha N^b$, with $b \sim 2.7$ (dotted line in Fig. 2A.2). Data could also be fitted as well by a straight line intersecting the x -axis at $N \sim 40$ rpm. In the first case, t_{peak} would increase tremendously below 40 rpm and it will tend towards infinity as N decreases. The second case would correspond to the existence of a threshold of the mixing speed ($30 \text{ rpm} < N_{\text{threshold}} < 50 \text{ rpm}$), below which the development of the gluten network would be hindered.

III.4. Effect of flour/water ratio on baseline torque and peak development time

Effect of F/W ratio on mixing curves is given in Fig. 2A.1d-f for the medium mixing speed. Decreasing the F/W ratio decreases the baseline torque Γ_b and the apparent baseline viscosity η_b consequently (see Table 2A.2). Fig. 2A.3 shows the bilogarithmic plot of the variation of η_b with F/W ratio for the three flours. Data of an extra experiment performed with flour Orvantis at a lower F/W ratio (0.83) and 100 rpm is also given (vertical arrow, Fig. 2A.3).

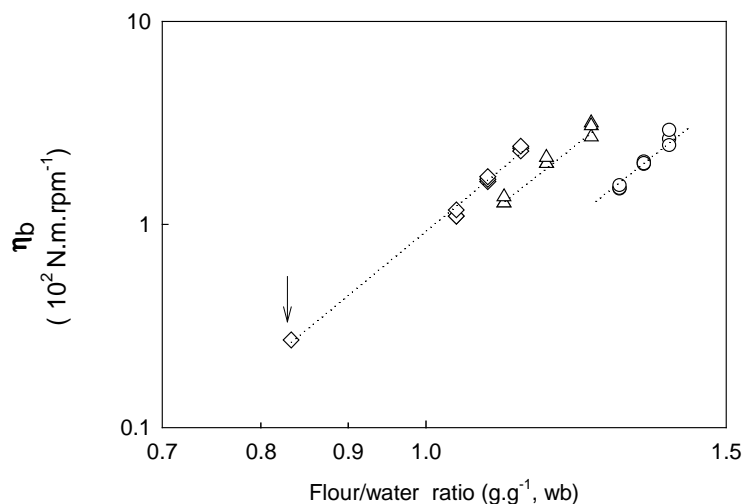


Fig. 2A.3. Influence of flour/water ratio on dough apparent baseline viscosity (η_b). Results from (◇) Orvantis, (△) Caphorn and (○) Isengrain mixed at 80, 90, 100 rpm and 25°C. Arrow indicates extra experiment made with Orvantis (F/W ratio = 0.83, 100 rpm, 25°C).

The three flours show roughly linear parallel behaviours suggesting that water acts as a diluting phase that depresses η_b , according to a power law relation with a rather similar exponent. At any given F/W ratio, η_b Isengrain < η_b Caphorn < η_b Orvantis, suggesting differences in the water absorption capacity of the three flours. The apparent baseline viscosity values of the three varieties ranked in agreement with their Farinograph water absorption and total arabinoxylan content (Table 2A.1). In addition, soluble arabinoxylans which are likely to contribute to the dough water phase viscosity were significantly lower for Isengrain compared to Caphorn and Orvantis (Table 2A.1).

Decreasing the F/W ratio strongly delays the onset of torque rise (Fig. 2A.1d-f). For a given mixing speed and flour type, η_b and t_{peak} were found to be inversely related, as shown in Fig. 2A.4a-c. The slope of the relationship becomes steeper at higher mixing speed, in coherence with the occurrence of a threshold mixing speed. Fig. 2A.4a-c also reveals large differences between flours. At any given apparent baseline viscosity (η_b), Isengrain dough took a longer time to develop than Caphorn and Orvantis doughs. Thus, the variable water absorption capacity of the flours, as far as it is reflected by their different viscosities, does not seem to be the sole factor controlling the mixing time.

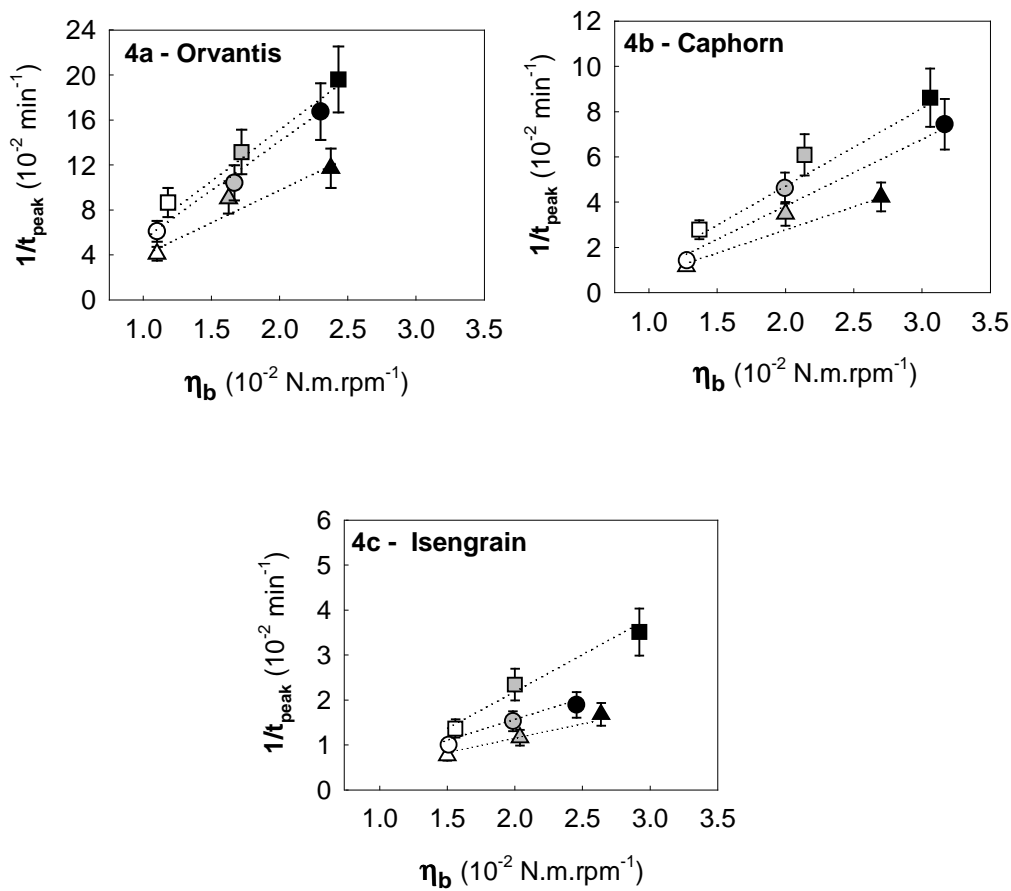


Fig. 2A.4. (a-c) Relationship between $1/t_{peak}$ and apparent baseline viscosity (η_b). Mixing speed (Δ) 80 rpm, (\circ) 90 rpm and (\square) 100 rpm. Flour/water (F/W) ratios as in Fig. 2A.1d-f; (closed symbols) high F/W ratio, (grey symbols) medium F/W ratio, (open symbols) low F/W ratio. Batters were mixed at 25°C.

III.5. Protein phase distribution during dough mixing

Pictures taken during the mixing of a dough Isengrain ($N = 90$ rpm, $F/W = 1.34$) are shown in Fig. 2A.5a-h. Images on the left side of Fig. 2A.5a-h correspond to a view of 1.0×0.5 cm of the dough surface. Corresponding enlarged details (x2) are given on the right side.

The first picture was taken at the beginning of the mixing, during the initial decrease of torque (Fig. 2A.5a). It shows numerous and small protein lumps homogeneously dispersed on a green background. Size of lumps does not exceed $20 \mu\text{m}$. At the end of the initial stress overshoot period (Fig. 2A.5b), the gluten lumps become larger ($100\text{-}200 \mu\text{m}$ radius) and the background becomes whiter, manifesting the strong aggregating tendency of the smaller initial gluten particles. During the following 50 min mixing period, corresponding to the lag phase, the main change is the apparition here and there of a few filamentous protein structures (Fig. 2A.5c-f).

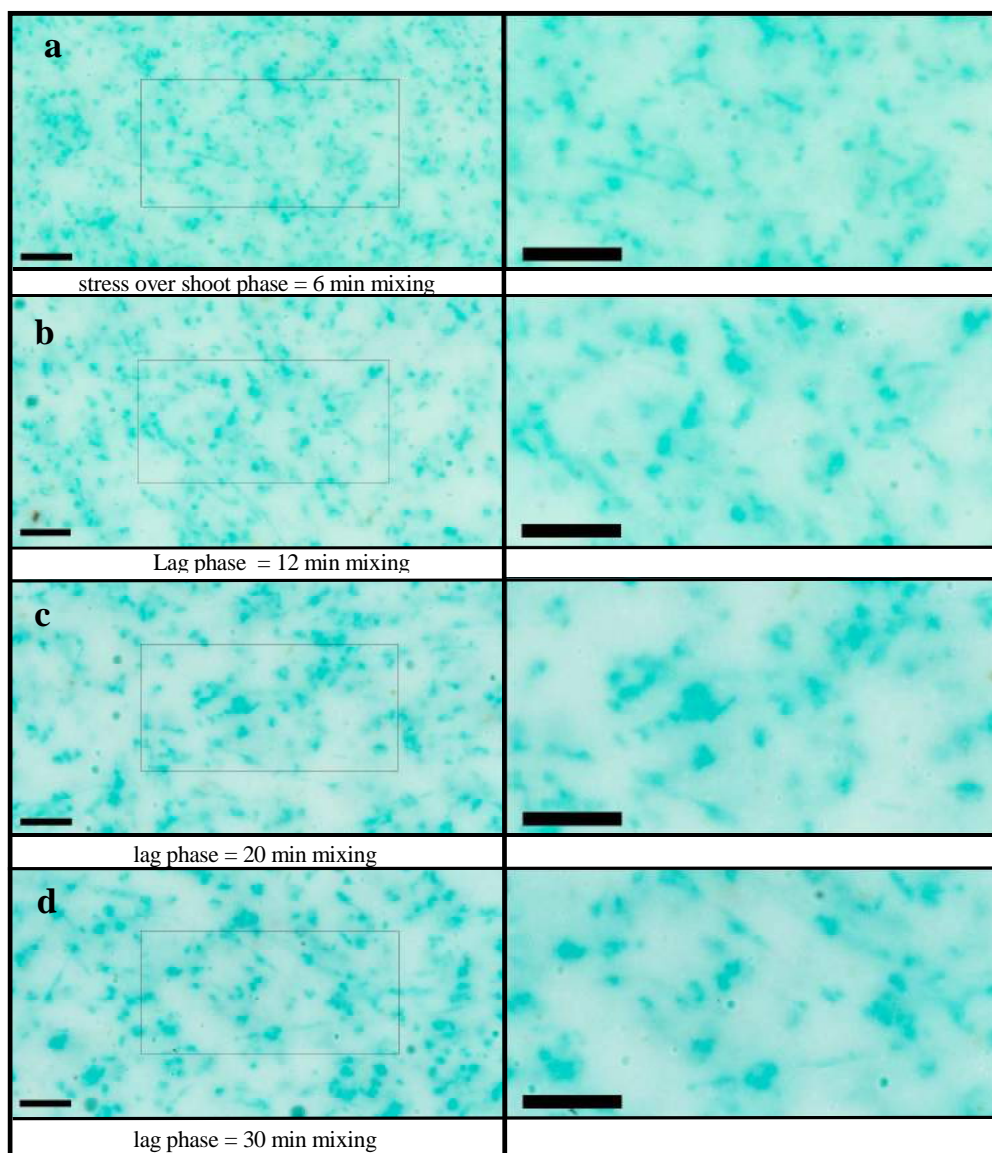


Fig. 2A.5. (a-h) Evolution of the protein phase distribution in batter Isengrain during mixing. Flour/water (F/W) ratio = 1.34, mixing speed = 90 rpm, mixing temperature = 25°C. See Fig. 2A.1f for torque mixing curve. Scale bar = 1 mm. Picture size 1.0 x 0.50 cm (left side), 0.5 x 0.25 cm (right side).

These protein strands seem to grow in length and in number as the mixing time approaches the end of the lag phase. At the end of the lag phase (Fig. 2A.5f), strands are so long that they begin to span the distance between neighbouring gluten lumps. Fig. 2A.5g, taken in the middle of the torque rise, shows that gluten lumps are now more frequently connected to each other by gluten strands. At t_{peak} (Fig. 2A.5h), gluten lumps have disappeared and the gluten phase is homogeneously spread over the dough into the form of a filamentous network of gluten strands. Upon further mixing, the filamentous network structure vanished (not shown). The dough becomes evenly green, demonstrating that the size of gluten particles or strands, if still existing, is now below the image resolution scale ($6.9 \mu\text{m} = 1 \text{ pixel}$).

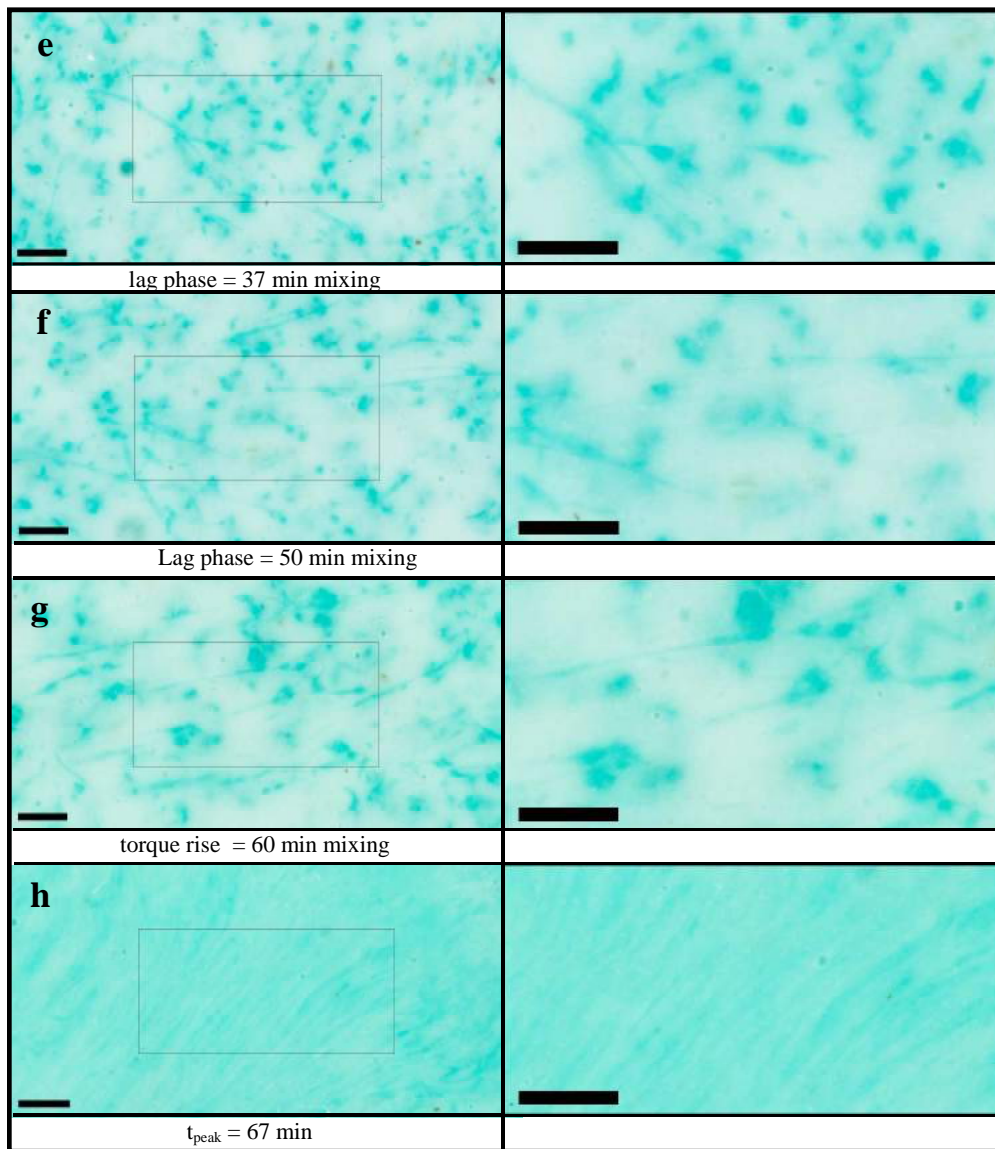


Fig. 2A.5. (Continued)

IV. Discussion

The three flours tested are in the medium French baking range. They look very common and similar in terms of their biochemical composition, Farinograph water absorption, Farinograph mixing time and Chopin Alveograph characteristics (Table 2A.1). Regarding mixing times and F/W ratios required for optimal development as batters, they exhibit very contrasted behaviours. Water acts both as an enhancer of flour differences and as a depressor of gluten network development rate.

A specific mechanical energy input of about 40 kJ/kg is required for optimal dough development in the Chorleywood bread process for a wide range of flours (Chamberlain et al., 1967). Less energy (20 kJ/kg) is required for the “French baguette” development in a planetary mixer. As indicated by Fig. 2A.6, very contrasted SME values were calculated for the flour-water batters studied here. A high mechanical energy input (from 100 to 160 kJ/kg) was needed to develop flour-water batters from Isengrain, while the required energy was lower for Caphorn (42-90 kJ/kg) and still much lower for Orvantis (14-21 kJ/kg). Moreover, for the same flour type, SME varied with mixing speed and F/W ratio (Fig. 2A.6). Typically, less energy was required as mixing speed rises from 80 to 100 rpm. The situation is even more drastic for the flour Isengrain for which SME is always varying with mixing speed for the three F/W ratios tested.

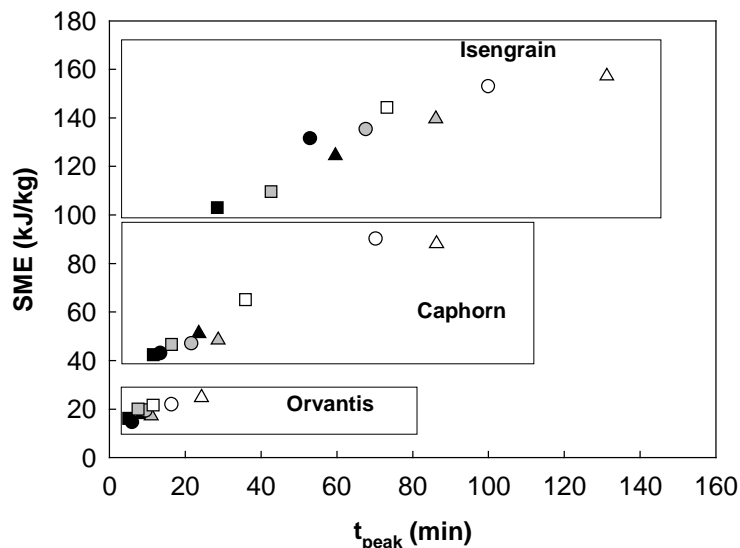


Fig. 2A.6. SME required to develop batters Orvantis, Caphorn and Isengrain. Batters from same flours are grouped inside the same insert. Mixing speed (Δ) 80 rpm, (\circ) 90 rpm and (\square) 100 rpm. Flour/water (F/W) ratios as in Fig. 2A.1d-f; (closed symbols) high F/W ratio; (grey symbols) medium F/W ratio; (open symbols) low F/W ratio. Batters were mixed at 25°C.

Actually, even in bread dough mixing, SME cannot be viewed as a real control parameter of the mixing process. It is rather an output variable that represents the cumulated power spent during dough mixing until t_{peak} and its calculation requires torque and t_{peak} data. SME is a useful tool in order to adjust the mixing time as a function of the mixing speed or the dough temperature and it gives an estimate of the efficiency of the mixing device. In that respect, values calculated for the batters reveal that the efficiency of the planetary mixer

strongly depends on the flour type. Caphorn and Isengrain doughs needed far more energy than Orvantis in order to develop into a gluten network.

The parametric control of t_{peak} values was further investigated in order to propose a general framework for the prediction of gluten network development in flour-water batter. Results presented in Figs. 2A.2 and 2A.4 showed that t_{peak} was inversely related, on the one hand, to the apparent baseline viscosity η_b and, on the other hand, to more than the square of mixing speed, suggesting that the instantaneous power of the mixer delivered during the lag phase ($\Gamma_b.N = \eta_b.N^2$) might control dough development.

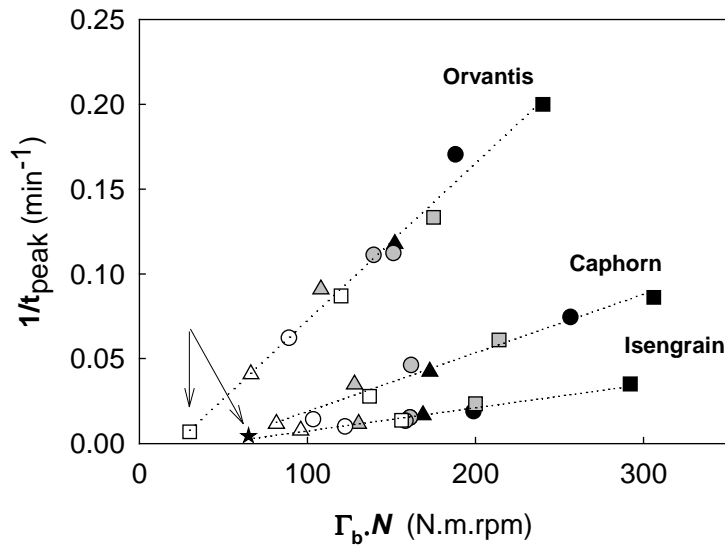


Fig. 2A.7. Prediction of t_{peak} from instantaneous power ($\Gamma_b.N$) delivered to the dough during the lag phase. Lines are linear regression plots of mixing data obtained for each flours. Mixing speed N (Δ) 80 rpm, (\circ) 90 rpm and (\square) 100 rpm. Flour/water (F/W) ratios as in Fig. 2A.1d-f; (closed symbols) high F/W ratio; (grey symbols) medium F/W ratio; (open symbols) low F/W ratio. Batters were mixed at 25°C. Arrows indicate extra experiments made with Orvantis ($N = 100$ rpm, F/W ratio = 0.83, 25°C) and Isengrain ($N = 50$ rpm, F/W ratio = 1.39, 25°C).

As shown in Fig. 2A.7, the instantaneous power delivered to the dough during the lag phase ($\Gamma_b.N$) allows a good prediction of the inverse of t_{peak} . This parametric variable controls the gluten network development rate and its intensity is related to the flow behaviour of the batter, i.e. to the baseline torque or viscosity. The relevant equation of the plots in Fig. 2A.7 has the following form:

$$1/t_{peak} = a \Gamma_b.N - b \quad (3)$$

with a and b varying with flours and being given in Table 2A.3.

The validity of Eq. (3) was checked by performing extra mixing tests with Orvantis (F/W ratio = 0.83; $N = 100$ rpm) and Isengrain (F/W ratio = 1.39; $N = 50$ rpm). Additional points were aligned with the previous series (arrows on Fig. 2A.7).

Comparison of the values calculated for the a parameter shows that, adjusted at the same baseline torque, Orvantis dough will develop 2.7 and 6.4 times faster than the corresponding Caphorn and Isengrain doughs. Baseline torque, i.e. apparent baseline viscosity, by itself cannot be understood as a real causal parameter of t_{peak} , otherwise a unique relationship would have been found for the three flours in Fig. 2A.7.

As expressed in Eq. (3), t_{peak} will tend towards infinity when $\Gamma_b.N$ tends towards $[\Gamma_b.N]_{crit} = b/a$, $[\Gamma_b.N]_{crit}$ representing the critical combination of the mixing speed and the F/W ratio for which gluten development would never occur. Indeed, an attempt to develop a more diluted batter Orvantis (F/W ratio = 0.7) at 100 rpm remained unsuccessful after more than 5 h mixing. In that case, the $\Gamma_b.N$ combination remained below the critical threshold ($[\Gamma_b.N]_{crit}$) because the baseline torque was very low (below 0.2 N.m). Excessive flour dilution, as well as very low mixing rate (see above) inhibits gluten network development. The critical $\Gamma_b.N$ combination was lower for Orvantis than for Caphorn or Isengrain (Table 2A.3). The low $[\Gamma_b.N]_{crit}$ found for Orvantis could explain why an almost constant and moderate SME value was observed for batters made with this flour (Fig. 2A.6).

Table 2A.3. Results of the fitting of curves from Figure 2A.7.

Flours	Equation ^a			R^2
	$1/t_{peak} = a\Gamma_b.N - b$		$[\Gamma_b.N]_{crit}$	
	Slope (a)	Origin (b)		
Orvantis	9.268×10^{-4}	1.998×10^{-2}	21.55	0.981
Caphorn	3.456×10^{-4}	1.564×10^{-2}	45.25	0.971
Isengrain	1.435×10^{-4}	7.439×10^{-3}	51.85	0.975

^aSlope (a) in $\text{min}^{-1} \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{rpm}^{-1}$, Origin (b) in min^{-1} , $[\Gamma_b.N]_{crit}$ ($= b/a$) in $\text{N} \cdot \text{m} \cdot \text{rpm}$.

Corroborated by the discrete micro-structure of the system during the lag phase (see Fig. 2A.5a-h), we can reasonably assume that flour-water batter can be assimilated to a suspension of small rigid particles (the starch granules) and large and deformable microscopic gluten lumps. According to this simplistic view, the flow behaviour of the batter should be controlled by the viscosity of the suspending fluid and by the volume fraction of solid particles (i.e. the F/W ratio and the absorption capacity of the flour) like in dense non-colloidal suspensions (Krieger and Dougherty, 1959). In suspensions of solid particles,

transition between free individual flowing and collective behaviour of the particles is observed when the solid volume fraction exceeds 41-45% (Coussot and Ancey, 1999; Mansoutre et al., 1999; Quemada and Berli, 2002), a range corresponding to the starch volume fraction of the less diluted batters studied here. Peighambardoust et al. (2006b) recently gave evidence that shear-banding might be responsible of the gluten-starch demixing observed in bread dough developed under simple shear flow. Similarly, Tolstoguzov (1997) postulated that, in mixed dough, the migration of starch granules in the direction of the shear gradient contributed to gluten-starch segregation.

Following the assumptions recently introduced by Kieffer (2006a,b), Kieffer and Stein (1999) and Peighambardoust et al. (2006b), we postulate that above some critical F/W ratio, initial formation of gluten lumps is driven by segregation of starch and gluten particles upon shearing, but also by the attractive potential of gluten proteins. It means that the formation of gluten lumps would not only result from collisions of small micrometric gluten particles derived from the erosion of the flour particles but also from colloidal attractions between gluten proteins. We believe that formation of weakly cohesive protein flocs resulting from colloidal attracting forces could be responsible for the stress overshoot observed at the beginning of the mixing. Usually, this kind of stress-time response is related to a destructuring action of the shear flow on the material structure.

During the lag phase, once large gluten lumps were formed, the increasing occurrence of filamentous gluten lumps exemplifies the subsequent structural evolution of the system. In planetary mixer, both extensional and pure shear strain are encountered as the hook moves close to the bowl wall and then far from it. The applied stresses are of transient nature because only part of the dough mass is sheared at once. So, the particles in the suspension undergo repeated cycles of strain and relaxation. Globally the intensity of the shear stress applied to the system remained unchanged since the bulk viscosity remained stable. Locally, the situation might be more complex and we can imagine that gluten-starch segregation under shearing comes with some extra-squeezing of the gluten lumps between the layers of starch granules. In that respect, larger gluten lumps would suffer larger strains. We propose that gluten lumps undergo some mechanically driven maturation step during the lag phase, by repeated cycles of strain and relaxation, which finally results in their flowability and their transformation in gluten strands.

Differences in behaviour of different cultivars would rely on both the attractive potential of their gluten proteins and their starch volume fraction, linked to the F/W ratio. Both factors should influence the batter viscosity and its flow properties. Adopting the

classification proposed by Coussot for granular materials, flour-water batter would then belong to the class of granular pastes in which both soft and hard interactions influence the flow behaviour (Coussot and Ancey, 1999; Coussot, 2005). The attractive potential of gluten proteins would play a larger role in determining the rate of dough development in the case of batters than in the case of usual bread doughs. Increasing the volume of the suspending liquid phase might shift the equilibrium between free and aggregated forms of gluten colloidal particles. It would be the reason why the three flours, which looked very similar when processed at high flour/water ratio, exhibited such wide differences when processed as batters.

V. Conclusion

This work aimed at studying the microstructural formation and the key mixing parameters involved in the gluten network development of flour-water batter. At a microscopic scale, total gluten formation occurs in two successive steps. During the first step, mixing promotes the formation of micro-sized gluten lumps, transforming the flour-water mixture into a suspension of gluten lumps and starch granules in water. Mechanisms of gluten lumps formation would rely both on the action of hydrodynamic forces which promotes starch and gluten segregation and on the colloidal attraction of gluten proteins. Gluten lumps then evolve during the second step into gluten strands accountable for the dough viscosity increase to t_{peak} . We define that the optimal gluten network development occurs when all the gluten is under its filamentous form and entraps all the dough mass. We propose that during the lag phase, gluten lumps undergo a maturation process that finally results in their flowability under mixing, allowing the formation of gluten strands. Whether this maturation involves a change in the protein composition of dough, in the visco-elastic properties of gluten or in the size of gluten lumps will be the subject of our future investigations.

The time needed to reach optimal gluten network development in batter was inversely related to the instantaneous power of the mixer delivered to the dough during the lag phase ($= \Gamma_b \cdot N$) and not to the total SME at t_{peak} . It reveals the importance of the baseline torque (Γ_b) and baseline dough viscosity in gluten development. However, this relationship strongly depends on the flour type.

Our results show that increasing the dough water content can be a convenient tool to get new structural data on the phenomenological events leading to gluten network development. Water dilution strongly delays dough development and reveals large differences between otherwise very similar flours.

RESUME/CONCLUSION

Cette étude montre que la formation du réseau de gluten, au sein d'une pâte diluée, repose sur un mécanisme unique, constitué de deux étapes, contrôlé par la puissance instantanée délivrée par le pétrin au cours de la phase de latence ($I_b.N$), et dont la cinétique dépend des paramètres du pétrissage (hydratation et vitesse). La première étape induit la formation de larges agrégats de gluten. Ce phénomène serait plutôt spontané et pourrait être le résultat d'une forte attraction colloïdale entre les particules de protéines de la farine et/ou d'un effet de ségrégation des AX. Cette première étape du mécanisme conduit à la formation d'une pâte diluée qui, dans sa phase de latence, peut être considérée comme une suspension de sphères molles déformables (agrégats de gluten) et de sphères dures non déformables (grains d'amidon) portées par un fluide visqueux, constitué de l'eau et des éléments solubles de la farine (AX notamment). Les agrégats de gluten seraient alors déformés par le laminage des grains d'amidon et par le cisaillement provoqué par le système de pétrissage pour se transformer en totalité en filaments de gluten, au cours de la deuxième étape du mécanisme.

Toutefois, cette étude montre un effet variétal très important. Tout d'abord, les farines présentent des capacités d'absorption d'eau très différentes, en raison de leur teneur en AX notamment. De plus, pour une même puissance instantanée fournie, qui intègre pourtant la différence de capacité d'absorption d'eau, Orvantis se développe beaucoup plus rapidement que Caphorn, et encore plus rapidement qu'Isengrain. Cela se traduit d'ailleurs par des écarts de SME nécessaires au développement optimal du gluten très élevés entre les trois farines étudiées (14-21 kJ/kg pour Orvantis, 42-90 kJ/kg pour Caphorn et jusqu'à 100-160 kJ/kg pour Isengrain). Dans les mêmes conditions de pétrissage, Orvantis présente une très grande stabilité au pétrissage par rapport aux deux autres farines. Pourtant, le fait d'obtenir une loi de dépendance du t_{peak} à la puissance instantanée similaire pour les trois variétés, où seuls les facteurs de la relation diffèrent, suggère fortement qu'un constituant biochimique interviendrait également dans les mécanismes d'agglomération du gluten.

Cette étude paramétrique est un premier pas pour appréhender les mécanismes d'agglomération du gluten. Elle sera suivie, notamment, par l'étude des modifications biochimiques se produisant sur les protéines du gluten au cours du pétrissage.

Chapitre 2B – Calibration rhéologique du pétrin P600

OBJECTIF

Dans le chapitre précédent, nous avons clairement mis en évidence que le développement optimal du réseau de gluten est contrôlé mécaniquement par la puissance instantanée délivrée par le pétrin au cours de la phase de latence ($G_b.N$). Toutefois, la relation trouvée est propre à une variété de farine mais elle est surtout vraie pour la géométrie du pétrin utilisé dans l'étude. Ce pétrin présente d'ailleurs une géométrie relativement complexe, même si elle est courante dans le commerce. La pale, en rotation sur elle-même, tourne autour de l'axe central, telle la Terre autour du Soleil. On définit d'ailleurs le pétrin P600 comme un pétrin planétaire. Selon la géométrie des éléments de pétrissage (bol, pale, rayon de rotation) et la nature du fluide, ce mouvement peut facilement induire à la fois du cisaillement, de la compression ou de l'élongation. Or, la nature de la déformation influence énormément le développement du réseau de gluten (Lee et al., 2001; Peighambardoust et al., 2006b).

D'autre part, cet équipement de pétrissage mesure un couple en N.m et une vitesse de rotation en rpm, unités qui ne font pas partie du S.I. et dont les valeurs sont exclusivement propres à ce pétrin. Dans ces conditions, il est très difficile de transposer les résultats obtenus sur ce pétrin à d'autres pétrins, et vice-versa. En effet, ce pétrin n'a encore jamais été utilisé dans la littérature pour pétrir un mélange d'eau et de farine. Tous les essais de pétrissage sont, jusqu'à présent, menés sur des pétrins de laboratoire du type farinograph ou mixograph dont la géométrie est totalement différente et dont les valeurs de couple et de vitesse sont également exprimées en unités arbitraires. Pour exploiter davantage la multitude de résultats obtenus avec différentes géométries de pétrissage, il faudrait homogénéiser les données et les exprimer en unités du S.I.: Pa.s pour la viscosité de la pâte et s^{-1} pour la vitesse de rotation de la pale. Une telle calibration, qui permettrait également d'intégrer les résultats obtenus sur des rhéomètres, qui expriment déjà les valeurs de viscosité et de vitesse de cisaillement en unités du S.I., permettrait surtout de faciliter le transfert industriel des résultats.

L'objectif de ce chapitre est donc de calibrer le pétrin P600 dans le but de convertir les valeurs de couple (en N.m) et de vitesse de rotation (en rpm) en valeurs de viscosité de pâte (en Pa.s) et de vitesse de cisaillement de la pale (en s^{-1}). Cette étude devrait également permettre de mieux comprendre le fonctionnement du pétrin utilisé dans l'étude.

Publication n°2 - Power consumption of a planetary mixer: Application for the determination of apparent shear rate and viscosity of flour-water batters*

Abstract

Reynolds and power numbers are convenient parameters to characterize the power consumption of stirred tanks. These dimensionless numbers are now well established for agitated vessels equipped with a vertically and centrally mounted impeller for both Newtonian and non-Newtonian fluids. To our knowledge, there is more ambiguity concerning their definition for planetary mixers, especially when these mixers present dual motions to achieve energy input and homogenization. In this study, we proposed modified Reynolds and power numbers for such a planetary mixer: the mixer bowl P600 from Brabender we use here to mix flour-water batters. This mixer is usually used in non-food area for testing the properties of plastic powders, like their liquid absorption or their plasticizer absorption rate. Experimental power measurements carried out on this mixer showed that the modified dimensionless numbers proposed, which involved the maximum impeller tip speed as the characteristic velocity, succeeded in obtaining a unique power curve. This agreement proved that the dimensional analysis proposed can be well adapted for engineering purposes. We used the dimensional analysis to calibrate the mixer bowl P600 from a rheometrical point of view. We determined the specific mixer constants K_p (= 27.85) and K_s (= 4.94) that respectively links the mixing torque to the stress and the mixing speed to the shear rate. We found K_s is a pure geometrical constant of the mixer bowl P600. This calibration allowed us to extract the viscosity/shear rate curves from the recorded torque/rotor speed data. Results demonstrated the reliability of the calibration method used. Such a technique could be useful to provide accurate viscometric data during the mixing process and to compare the power consumption performances of planetary mixers with those of well-established technologies.

*Auger, F., Morel, M.H., Dewilde, M., Redl, A., Delaplace, G. *In preparation.*

I. Introduction

Several types of planetary mixers and off-centered double agitators are widely used in flour dough mixing processes. It is well known that mixing parameters strongly influence the gluten network or dough development. Among the process parameters, we recently showed that the instantaneous power delivered to a flour-water batter is a key parameter to control the process of gluten network development (**Chapter 2A**). The nature of the mixing action was also shown to be critical for dough development (Lee et al., 2001; Peighamardoust et al., 2006b). Using numerical flow simulations, Jongen et al. (2003) showed that conventional dough mixers induce shear and/or elongational flows in different ways. Nevertheless, little attention was paid in literature to the calibration of dough mixers from a rheometrical point of view. Experimental laboratory mixers used for the assessment of flour quality (Mixograph, Farinograph, Consistograph) record the torque (expressed in N.m or in arbitrary units) as a function of mixing time at a fixed rotational speed (expressed in revolutions per minute, or rpm). Torque values are dependent on the geometry of the mixer used and it is actually very difficult to have an idea of the shear rates (in s^{-1}) and dough viscosities (in Pa.s) encountered during mixing (Haraszi et al., 2008). However, the knowledge of these fundamental data in universal units would facilitate mixer scale up, comparison of mixers efficiencies and relation with data obtained from simple shear experiments conducted with a rheometrical instrument. The concept of mixer calibration has been extensively used since the pioneer work of Metzner and Otto (1957), in which they proposed a procedure for estimating the power consumption when mixing non-Newtonian fluids in systems with different geometries. Two dimensionless variables, the power number N_p and the Reynolds number R_e , were chosen to describe the mixing processes. The mixer calibration is based on the determination of mixer constants K_p and K_s linking mixing torque (Γ) to viscosity (η), and mixing speed (N) to shear rate ($\dot{\gamma}$), respectively. Hence, the knowledge of K_p and K_s allows to express experimental data in universal units:

$$\eta = f(N, \Gamma, K_p) \quad \text{and} \quad \dot{\gamma} = f(N, K_s) \quad (1)$$

where N is the mixing speed (in $rev.s^{-1}$), Γ is the mixing torque (in N.m), K_p is the product of the power number N_p by the Reynolds number R_e when mixing Newtonian fluids under laminar regime and K_s is the constant of proportionality that links the effective shear rate (in s^{-1}) and the rotational speed of the impeller (in $rev.s^{-1}$) when mixing non-Newtonian fluids under laminar regime. The use of mixer constants K_p and K_s to determine apparent viscosities

(in Pa.s) and shear rates (in s^{-1}) is actually well documented in open literature (Delaplace et al., 2000; Rieger and Novak, 1973; Shamlou and Edwards, 1985; Brito-de la Fuente, 1991; Carreau et al., 1993). Nevertheless, the determination of K_p requires the knowledge of dimensionless numbers N_p and R_e . The determination of those dimensionless numbers has been well established for classical mixers, referring to impellers vertically and centrally mounted in the tank. Unfortunately, this is not yet the case for off-centered double agitators, co-axial and planetary mixers. However, these mixing equipments are taking a big sweep in process industry, fulfilling the need of consumers for complex products with specific functionalities. Analysis of their performance characteristics have appeared only recently in the literature. Tanguy et al. (1996, 1999) have conducted pioneer and more intensive works on non-conventional mixers. However, the literature is still scarce if we focus only on planetary mixers (Landin et al., 1999; Zhou et al., 2000; Jongen, 2000; Delaplace et al., 2004, 2005, 2006). These papers have highlighted the difficulties to compare the performances of planetary mixers with those of well-established mixers. Therefore, it is needed to modify the dimensional analysis established for classical mixers and to adapt it for non-conventional mixers. For planetary mixers, the problematic issue is to define the characteristic velocity and length of the mixing element.

Delaplace et al. (2005, 2006) have recently investigated, through a dimensional analysis, the power consumption for a particular planetary mixer: the TRIAXE[®] system, which combines two perpendicular revolutionary motions. They proposed modified Reynolds and power numbers, which involved the maximum impeller tip speed as the characteristic velocity and a dimension perpendicular to the vertical axis of revolution as the characteristic length. They showed experimentally that such dimensionless numbers allowed to obtain a unique power and mixing characteristic of the mixing system, regardless of a variation in speed. Moreover, the modified dimensionless numbers proposed by these authors are consistent with the definition of classical Reynolds and power numbers when the impeller is forced to perform only one motion around the vertical axis in the tank, as in the case of a classical mixing system.

To our knowledge, such an approach has not been applied for planetary mixers used for flour dough mixing. We propose to use this methodology on the planetary mixer bowl P600 from Brabender we use to mix and develop flour-water batters (**Chapter 2A**). The aim of this paper is (i) to propose and ascertain the reliability of modified Reynolds and power numbers for this mixer, (ii) to use the power curve obtained to propose mixer constants K_p and K_s for this particular mixer using Newtonian and shear-thinning fluids as calibration

fluids and, finally (iii) to determine apparent shear rates and batter viscosities encountered in our mixing device, allowing to follow the dough development by plotting the apparent viscosity (in Pa.s) as a function of mixing time.

II. Experimental

II.1. Mixing equipment

The mixing equipment used was a planetary mixer bowl P600 (Brabender OHG, Germany) equipped with a dough hook (Kenwood stirring insert, Brabender OHG, Germany) and thermostated with a water double jacket (Fig. 2B.1).



Fig. 2B.1: Picture of the planetary mixer bowl P600 investigated in connexion to the lab-station unit.

The mixer was coupled to a Plastograph lab-station (Brabender OHG, Germany) which allows continuous torque, speed and temperature recording. The experimental temperature (22, 25 or 40°C) varied in function of the tested fluid (Tables 2B.1-2B.2). The hook displacement is characterized by two revolutionary motions, gyration and rotation, around the vertical central axis. Gyration is the revolution of the vertical axis of the hook around the center of the mixing bowl, whereas rotation is the revolution of the hook on its own vertical axis (Fig. 2B.2). We determine N_G and N_R respectively as the gyrational and rotational impeller speeds. These double motions, turning in opposite direction, allowed the

hook to periodically come in contact with the entire volume of the vessel. In this work, the mixing tool was a dough hook with a diameter $d_R = 9$ cm fixed inside the rotating central orbit with a diameter $d_G = 6$ cm (Fig. 2). The vessel used was a cylinder with a conical bottom and the height of the impeller tip H_T was 4 cm. The diameter of the vessel at the impeller tip height H_T was 18 cm.

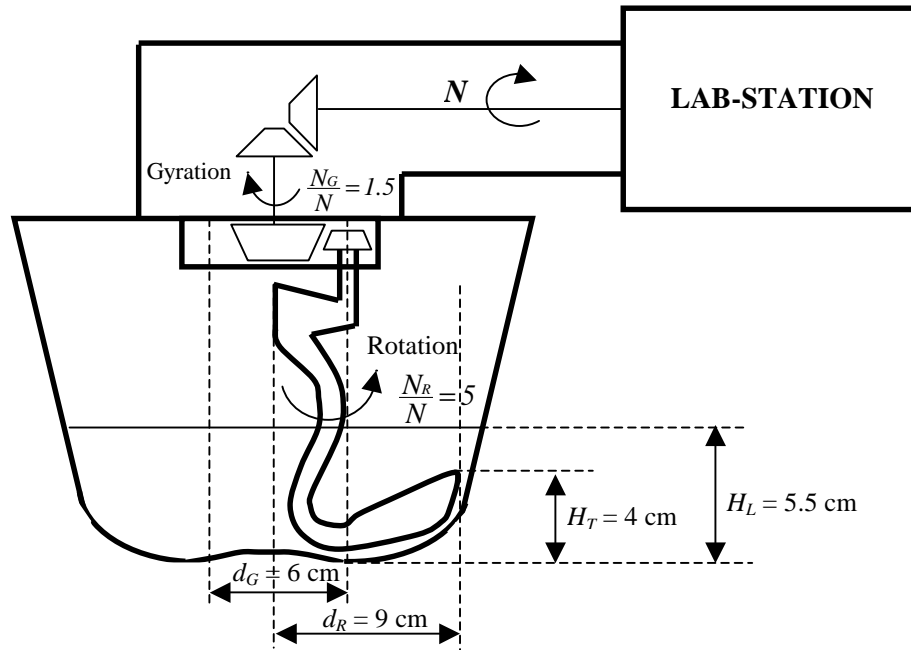


Fig. 2B.2: Main dimensions of the mixer bowl P600 equipped with a dough hook. N is the revolution speed of the drive shaft, N_G and N_R are respectively the gyrational and the rotational impeller speeds, d_G and d_R are respectively the diameter of the gyrational and the rotational motions and H_L and H_T are respectively the liquid height and the impeller tip height. H_T is a parameter which indicates the position of the agitator in the bowl.

The mixing equipment was driven by the unique variable speed motor of the lab-station, which induced rotations of the drive shaft (N) ranging from 0 to 150 rpm. The reduction gearbox ratio for the gyration (N_G/N) was equal to 1.5, whereas the reduction gearbox ratio for the rotation (N_R/N) was equal to 5 (Fig. 2B.2). The lab-station was equipped with a torquemeter in the range of 0 to 10 N.m, directly connected to the drive shaft. The total power consumption of the planetary mixer bowl P600 was obtained from torque and speed measurements carried out directly on the motor drive shaft, upstream from the reduction gearbox.

Experimental measurements were carried out with 1 Kg of several fluids, corresponding to a fluid height H_L of ca. 5.5 cm (Fig. 2B.2). The diameter of the vessel at the surface of the fluid (H_L) was 18.5 cm.

II.2. Mixed fluids

Different Newtonian and shear-thinning fluids were mixed in the planetary mixer bowl P600 at drive shaft speeds (N) ranging from 20 to 120 rpm. Four Newtonian fluids (Polybutene oils, Poulten Selfe and Lee Ltd., UK) covering a wide range of viscosity ($6 < \eta < 41$ Pa.s) were used to estimate the modified Reynolds and power numbers of the planetary mixer and to determine the power constant K_p of the mixing device. Five different shear-thinning fluids were prepared covering a wide range of flow behaviour index ($0.12 < n < 0.76$) to determine the constant K_s . The shear-thinning fluids tested were aqueous solutions of carboxymethylcellulose CMC, guar and alginate (Sigma, Germany). Details of the different fluids tested are given in Tables 2B.1-2.

Table 2B.1: Rheological and physical properties of the Newtonian fluids used

Fluids	Density ρ (Kg.m ⁻³)	Viscosity η (Pa.s)	Temperature of the agitated liquid θ (°C)
Polybutene oil S8000	874.0	5.94	40
Polybutene oil N4000	875.6	9.13	25
Polybutene oil S8000	881.7	21.13	25
Polybutene oil N15000	888.9	40.69	25

Table 2B.2: Power law parameters (k and n) of the shear-thinning fluids used

Fluids	k (Pa.s ^{n})	n	θ (°C)	Range of $\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)
2% Guar gum	105.27	0.12	22	10 - 90
3% CMC	173.37	0.26	22	10 - 100
2% CMC	59.53	0.34	22	10 - 100
6% Alginate	25.11	0.66	22	20 - 100
5% Alginate	9.34	0.76	22	10 - 90

II.3. Viscous properties of mixed fluids

The viscous properties of the mixed fluids were determined using a strain-controlled rheometer (ARES, TA Instruments, USA) equipped with a cone-and-plate geometry (50 mm diameter, 0.04 rad angle, 0.046 mm gap). Rheological experiments were performed at 22, 25 or 40°C, as during mixing experiments (Tables 2B.1-2). A power-law model (Ostwald de Waele's model) was chosen to describe the shear-thinning behaviour of the pseudoplastic fluids. The resulting values obtained by linear regression of the power-law constants (n and k) are given in Table 2B.2

III. Theoretical Aspects

III.1. Dimensional analysis for a conventional agitated vessel

We define a conventional agitated vessel as a mixer equipped with an impeller vertically and centrally mounted in the tank (Fig.2B.3). For a such mixer geometry, the dimensionless Reynolds number R_e and power number N_p are now well established when a Newtonian fluid is mixed:

$$R_e = \frac{\rho.N.d^2}{\eta} \quad (2)$$

$$N_p = \frac{P}{\rho.N^3.d^5} = \frac{2\pi.\Gamma}{\rho.N^2.d^5} \quad (3)$$

where ρ is the fluid density (in kg.m^{-3}), N is the mixing speed (in rev.s^{-1}), d is the agitator diameter (in m), η is the dynamic viscosity (in Pa.s), P is the power (in W) and Γ is the torque (in N.m).

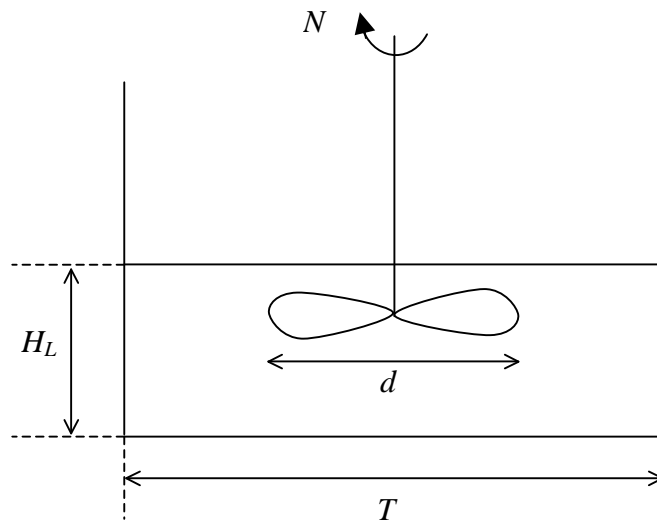


Fig. 2B.3: Classical geometric parameters and notations used for mixing vessel equipped with an impeller vertically and centrally mounted in the tank.

In a such mixer, the characteristic length and the characteristic velocity of the mixing element are, respectively, the agitator diameter d and $u_{ch} (= N.d)$. Note that u_{ch} is proportional to the maximum linear velocity encountered in the vessel ($= \pi.N.d$) and corresponds to the maximum impeller tip speed divided by π .

III.2. Dimensional analysis for the planetary mixer bowl P600

For a planetary mixer, the dimensional analysis is more complex due to the occurrence of two revolutionary motions. In a such mixer, the characteristic length of the mixing system is actually more complex to define and the maximum linear velocity encountered in the vessel does not depend on the mixing speed of the drive shaft (N) but on the two revolutionary speeds N_G and N_R . Therefore, the classical Reynolds and power numbers should be adequately modified to take into account the complexity of the combined motion followed by the agitator. In Fig. 2B.4, we propose a simplified sketch of the mixer bowl P600 to take into account its particular geometry.

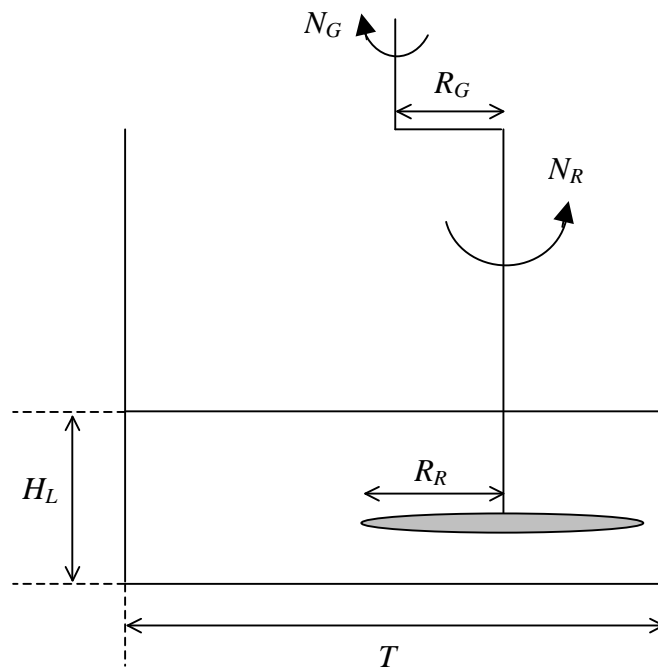


Fig. 2B.4: Sketch and symbols used for the mixer bowl P600.

Assuming that the acceleration due to gravity does not influence the mixing process of highly viscous fluids, the list of relevant dimensional parameters influencing the power consumption, when mixing Newtonian fluids with the planetary mixer bowl P600, is:

$$f(N_R, N_G, d_R, d_G, \rho, \eta, P, \text{installation conditions}) = 0 \quad (4)$$

where N_R and N_G are respectively the rotational and the gyrational impeller speeds, d_R and d_G are respectively the diameter of the rotational and the gyrational motions, ρ is the fluid density, η is the fluid dynamic viscosity and P is the power of the mixer. The installation conditions refer here to the position of the agitator in the vessel (H_T) and the liquid height H_L .

A closer look at Eq. (4) facilitates a reduction in the number of physical quantities in the list of relevant parameters. Indeed, it is possible to introduce as a characteristic velocity u_{ch} , a value which is proportional to the maximum impeller tip speed (discussed later) and consequently to reduce the list of relevant physical variables by three parameters (N_R , N_G and d_R):

$$f(u_{ch}, d_G, \rho, \eta, P, \text{installation conditions}) = 0 \quad (5)$$

For fixed installation conditions and a given planetary system (d_R/d_G is constant), this 5-parametric dimensional space leads to a power characteristic consisting of only two pi-numbers:

$$f(R_{eM}, N_{pM}) = 0 \quad (6)$$

with

$$R_{eM} = \frac{\rho \cdot u_{ch} \cdot d_G}{\eta} \quad (7)$$

$$N_{pM} = \frac{P}{\rho \cdot u_{ch}^3 \cdot d_G^2} = \frac{2\pi \cdot N \cdot \Gamma}{\rho \cdot u_{ch}^3 \cdot d_G^2} \quad (8)$$

where ρ is the fluid density (in $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), u_{ch} is the characteristic velocity (in $\text{rev} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), d_G is the diameter of the gyrational motion (in m), η is the dynamic viscosity (in Pa.s), P is the power (in W), Γ is the torque (in N.m) and N is the mixing speed of the drive shaft (in $\text{rev} \cdot \text{s}^{-1}$).

To sum up, we propose modified Reynolds and power numbers for the planetary mixer bowl P600 in Eqs. (7)-(8). The dimensional analysis of the power consumption of this mixer, in a fixed installation condition, leads to a relationship between the two pi-numbers (see Eq. 6) if a characteristic velocity proportional to the maximum impeller tip speed is introduced in the parametric dimensional space. In the following section, the way to compute the characteristic velocity for the mixer bowl P600 will be detailed. Then, the reliability of the two pi-numbers proposed will be ascertained, using power consumption measurements.

III.3. Determination of the characteristic velocity of the planetary mixer bowl P600

For the planetary mixer bowl P600, which combines the dual motions reported in Fig. 2B.4, the instantaneous position of a point M located at the impeller tip in a fixed reference frame R (0, \vec{X} , \vec{Y} , \vec{Z}) is given by (see Appendix 2B.I):

$$\overrightarrow{(OM)}_R = \frac{1}{l} \begin{pmatrix} R_G \cdot \cos(2\pi \cdot N_G \cdot t) + R_R \cdot \sin(2\pi \cdot N_R \cdot t) \\ R_G \cdot \sin(2\pi \cdot N_G \cdot t) + R_R \cdot \cos(2\pi \cdot N_R \cdot t) \end{pmatrix} \quad (9)$$

where N_R and N_G are respectively the rotational and the gyrational impeller speeds (in rev.s⁻¹), R_R and R_G are respectively the radius of the rotational and the gyrational motions (in m), t represents the time (in s) and l represents the altitude of the point M (in m) in the reference frame R.

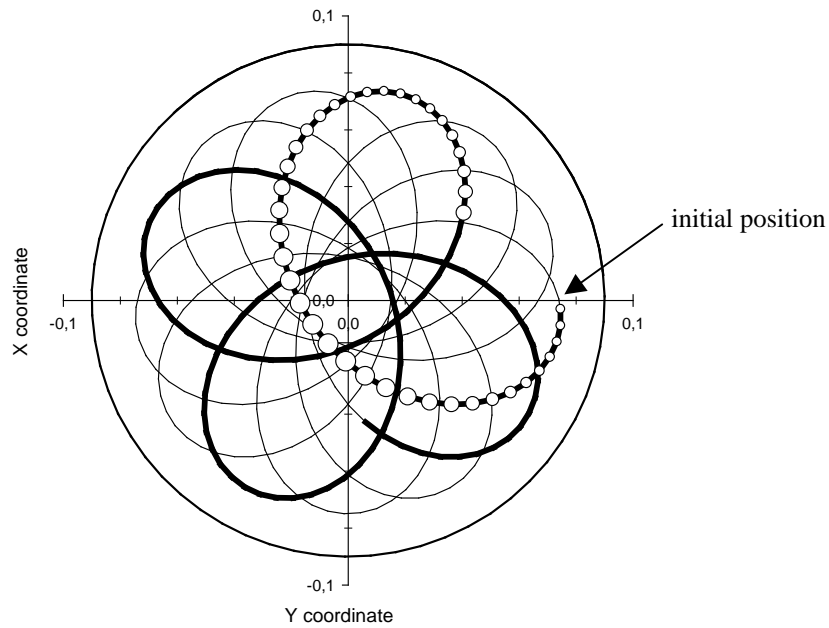


Fig. 2B.5: Path of the impeller tip inside the vessel, over one complete path (thin continuous line), over one gyration period (large continuous line) and over one rotation period (circle symbols). The size of circle symbols increases as the instantaneous impeller tip speed increases. Sight of the top of the vessel, in the reference frame R defined in Appendix 2B.I. Units are in m.

From Eq. (9), it is possible to draw the virtual path of the impeller tip into the vessel. Fig. 2B.5 is an example of the complete path performed by the impeller tip into the vessel for $N = 80$ rpm. The large circle appearing in Fig. 2B.5, with a diameter of 18 cm, corresponds to the cross section of the vessel with a horizontal plane located at the impeller tip height ($H_T = 4$ cm). We have chosen to draw the instantaneous position of the point M over one rotation

period, over one gyration period and over its complete path into the vessel (Fig. 2B.5). We can observe that the hook comes in contact with the entire volume of the vessel, except for:

- i) an area close to the vessel wall, where a gap of 1.5 cm is observed.
- ii) an area located in the middle of the bowl, around the central axis. This dead zone is contained in a circle with a diameter of 3 cm.

We might suggest that such dead zones exist to avoid contacts between the hook and the bowl wall in order to not damage the mixing device (see Fig.2B.2). Moreover, we can observe that the complete path of the impeller tip requires three gyration periods. Consequently, due to the reduction gearbox ratio of the motions ($N_R/N_G = 5/1.5$ and $N_G/N = 1.5$), the complete path of the impeller tip requires ten rotation periods and two revolutions of the drive shaft.

For the planetary mixer bowl P600, the magnitude of instantaneous impeller tip speed in an inert reference frame is defined as follows (see Appendix 2B.II):

$$u_{impeller\ tip}(t) = \sqrt{(2\pi \cdot R_G \cdot N_G)^2 + (2\pi \cdot R_R \cdot N_R)^2 - 2 \cdot (2\pi)^2 \cdot R_G \cdot R_R \cdot N_G \cdot N_R \cdot \sin(2\pi \cdot N_G \cdot t + 2\pi \cdot N_R \cdot t)} \quad (10)$$

The evolution of the instantaneous impeller tip speed with time is illustrated in Fig. 2B.6, for two mixing speeds ($N = 80$ rpm and $N = 100$ rpm) and over one gyration period, which requires 0.5 s at $N = 80$ rpm and 0.4 s at $N = 100$ rpm.

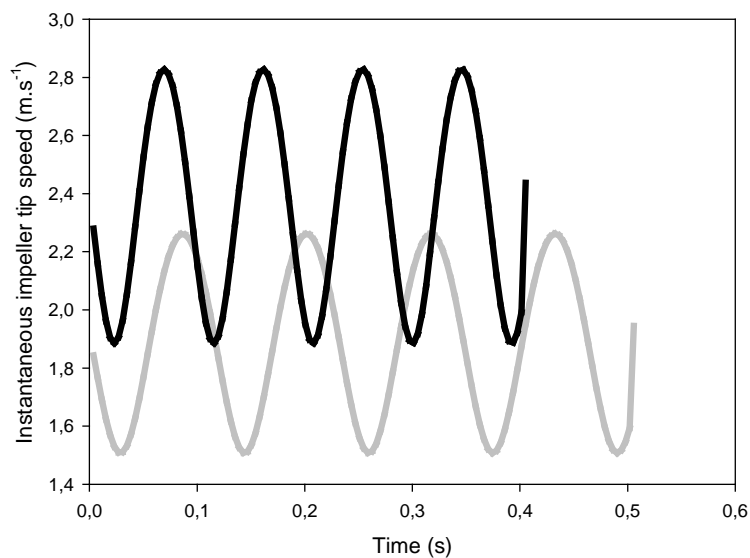


Fig. 2B.6: Example of evolution of the instantaneous impeller tip speed with time over one gyration period, at $N = 100$ rpm (black line) and $N = 80$ rpm (grey line)

For this planetary mixer, the instantaneous impeller tip speed $u_{impeller\ tip}(t)$ in an inert reference frame is not constant with time. We can observe successions of acceleration and deceleration phases, revealing the transient nature of the mixing into the vessel. Increasing the drive shaft mixing speed (N) increases the maxima and minima impeller tip speed values but also increases the amplitude of oscillation between these two extremes ($u_{impeller\ tip\ max} - u_{impeller\ tip\ min}$). From Eq. (10), it can be established that:

$$u_{impeller\ tip\ max} = \pi(N_G.d_G + N_R.d_R) = \pi N (1.5 d_G + 5 d_R) \quad (11)$$

$$u_{impeller\ tip\ min} = \pi(N_R.d_R - N_G.d_G) = \pi N (5 d_R - 1.5 d_G) \quad (12)$$

$$\begin{aligned} u_{impeller\ tip\ max} - u_{impeller\ tip\ min} &= 2\pi(N_G.d_G) = 2\pi N (1.5 d_G) \\ &= u_{impeller\ tip\ max} [3 d_G / (5 d_R + 1.5 d_G)] \end{aligned} \quad (13)$$

For the planetary P600 mixer, we found that this amplitude is equal to 33.3% of the maximum impeller tip speed (see Eq. 13), irrespective of the mixing speed (N). This result reveals that the transient nature of the mixing increases with N into the vessel of the mixer. We visualized the variation of the impeller tip speed into the vessel in Fig. 2B.5, by increasing the size of circle symbols in function of the corresponding impeller tip speed. In Fig. 2B.5, smallest circles correspond to the lowest impeller tip speed values and largest circles correspond to the highest ones. From this figure, we clearly note that maximal impeller tip speeds are encountered near the center of the vessel whereas minimal impeller tip speeds are encountered near the vessel wall.

For classical mixing systems, the characteristic velocity which interferes in Reynolds and power numbers is $N.d$. This characteristic velocity corresponds to the maximum linear speed ($= \pi N.d$) encountered in the vessel divided by π . By analogy with the dimensional analysis used for classical mixing systems, we propose a characteristic velocity for the planetary mixer bowl P600 defined as follows:

$$u_{ch} = \frac{u_{impeller\ tip\ max}(t)}{\pi} \quad (14)$$

The derivation of Eq. (10) allows us to obtain the instants for which the magnitude of instantaneous impeller tip speed reaches extrema (see Appendix 2B.III), and thus to compute

the maximum value for instantaneous impeller tip speed ($u_{impeller\ tip\ max}(t)$). Finally, using Eq. (14), u_{ch} can be deduced as follows:

$$u_{ch} = N_G \cdot d_G + N_R \cdot d_R \quad (15)$$

III.4. Determination of K_p and K_s for the planetary mixer bowl P600

Every mixing system is characterized by a power curve, which is the plot of the power number N_p versus the Reynolds number R_e . When mixing Newtonian fluids under laminar regime, it is readily shown that the power curve can be described by the following relationship:

$$N_p = \frac{K_p}{R_e} \quad (16)$$

where K_p is a geometrical parameter depending on the mixing system.

To calibrate the planetary mixer bowl P600, we propose to adapt Eq. (16) to our mixer as follows:

$$K_p = N_{pM} \cdot R_{eM} \quad (17)$$

where N_{pM} and R_{eM} are respectively the modified power and Reynolds numbers introduced in Eqs. (7)-(8).

For non-Newtonian fluids and as the shear rate varies through the vessel, there is an apparent viscosity profile which must be taken into account in the Reynolds number (Eq. 7). Metzner and Otto (1957) proposed to define an effective shear rate in the vessel, in such a way that the power curve in the laminar flow for both Newtonian and non-Newtonian fluids is quite similar. This effective shear rate value is classically linked to the impeller rotational speed as follows:

$$\dot{\gamma} = K_s \cdot N = K_s \cdot \frac{u_{ch}}{d} \quad (18)$$

where K_s is the constant of proportionality that links the effective shear rate (in s^{-1}) and the rotational speed of the impeller (in $rev.s^{-1}$) when mixing non-Newtonian fluids under laminar regime, u_{ch} and d are respectively the characteristic velocity (in $rev.m.s^{-1}$) and length (in m) of the mixing system.

We propose to adapt Eq. (18) to our mixer as follows:

$$K_s = \frac{\dot{\gamma} \cdot d_G}{u_{ch}} \quad (19)$$

where $\dot{\gamma}$ is determined from rheometrical data obtained for non-Newtonian fluids tested.

IV. Results and Discussion

IV.1. Newtonian power curve: determination of K_p

Power consumption measurements obtained for the planetary mixer bowl P600 when mixing the different Newtonian fluids are shown in Fig. 2B.7. Results are presented in terms of the modified power and Reynolds numbers, such as suggested in Eqs. (7)-(8). Fig. 2B.7 clearly shows that the power characteristic of the planetary mixer can be reduced to a unique power characteristic, like in the case of classical mixing systems, using the proposed dimensional analysis. This result proves to a certain extent the reliability of using maximum impeller tip speed u_{ch} as the characteristic velocity and diameter of the gyrational motion d_s as the characteristic length.

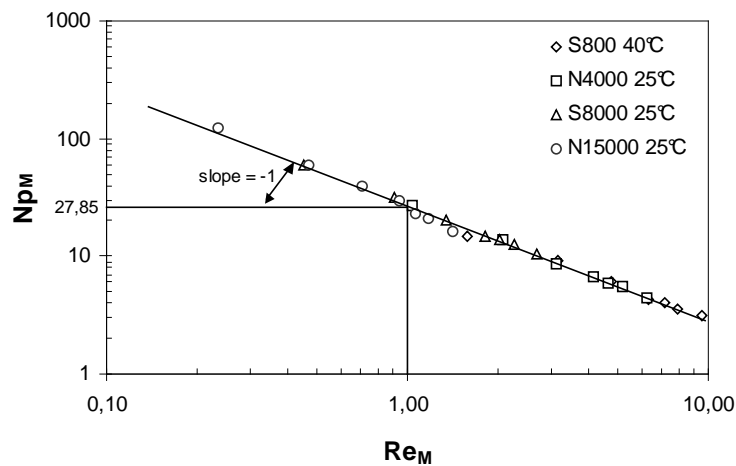


Fig. 2B.7: Power curve of the mixing bowl P600 studied with Newtonian polybutylene oils (see Table 2B.1). Log-log plot.

It can be noticed that the set of dimensionless numbers proposed above has never been ascertained for a planetary mixer combining a dual revolution motion around vertical axes, like the P600 mixer used here. Indeed, the only work dealing on the subject was done by

Delaplace et al. (2005). This work refers to a planetary mixer combining a dual revolution motion around perpendicular axes and allowing variable N_G/N_R ratio. In this sense, experimental measurements carried out with the planetary P600 mixer extend the validity of the previous work done by Delaplace et al. (2005), who had given ways to analyze power consumption for planetary mixers. It can be also noticed that the pi-numbers space proposed for the planetary P600 mixer has other advantages since it allows us to compare, on one same chart, the power consumption performances of this mixing equipment with those of classical mixing systems. This has been made possible by introducing the characteristic speed u_{ch} in the list of the relevant physical parameters.

Fig. 2B.7 also shows that the relationship between N_{pM} and Re_M is linear in the bi-log plot on the overall range of Re_M values obtained, which did not exceed a value of 10. It suggests that all the mixing experiments were performed in the laminar regime.

Moreover, it can be observed from Fig. 2B.7 that the product $N_{pM} \cdot Re_M$ is constant, as reported with classical mixing systems when mixing highly viscous fluids. The value of the product is $K_p = 27.85$. To our knowledge, this is the first time that such a constant is given for a planetary mixer used for dough mixing. Combining Eqs. (7)-(8)-(15) and (17) gives:

$$P = 27.85 \eta (N_G \cdot d_G + N_R \cdot d_R)^2 \cdot d_G \quad (20)$$

Eq. (20) gives clearly how the power draw varies with the dual revolution motion for the P600 mixer used and for Newtonian fluids. Eq. (20) has been proven to be valid when $Re_M \leq 10$.

IV.2. Determination of K_s for shear-thinning fluids

The experimental values of K_s for shear-thinning fluids are reported in Fig. 2B.8. A standard deviation of 10% was obtained on the mixer bowl P600. Hence, we can conclude from the Fig. 2B.8 that the K_s value of our planetary mixer is independent of the flow behaviour index of the fluid. It suggests that K_s is a pure geometrical constant of the mixer bowl P600 and its average value for this mixer is $K_s = 4.94$.

Some authors (Hall and Godfrey, 1970; Nagata et al., 1971; Rieger and Novak, 1973; Takahashi et al., 1984; Shamlou and Edwards, 1985) have already reported that K_s can be considered as a pure geometric parameter. More recently, Delaplace et al. (2000) observed a very slight increase of K_s with the flow behaviour index in the case of shear-thinning fluids ($0.11 < n < 0.63$) but they even considered this value as a constant.

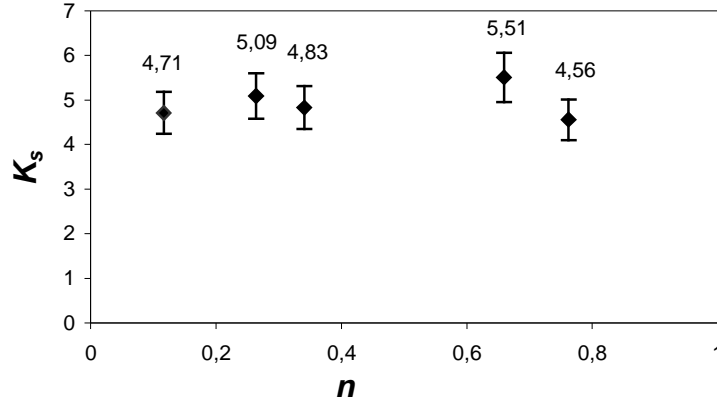


Fig. 2B.8: Evolution of the K_s values with the flow behaviour index of shear-thinning fluids for the mixer bowl P600 investigated.

IV.3. Apparent mixing rates and viscosities encountered in the mixer bowl P600 when mixing a flour-water batter

We obtained two pure geometric parameters (K_p and K_s), characterizing the power demand of the mixer bowl P600. This determination allowed us to calibrate our mixing device from a rheometrical point of view by expressing mixing speed and torque in terms of apparent shear rate and viscosity in universal units (s^{-1} and Pa.s, respectively), such as follows:

$$\dot{\gamma} = K_s \cdot \frac{u_{ch}}{d_G} = K_s \cdot \frac{N_G \cdot d_G + N_R \cdot d_R}{d_G} \quad (21)$$

$$\eta = \frac{\rho \cdot u_{ch} \cdot d_G}{Re_M} = \frac{2\pi \cdot N \cdot \Gamma}{K_p \cdot u_{ch}^2 \cdot d_G} \quad (22)$$

where N_R and N_G are respectively the rotational and the gyrational impeller speeds (in $rev.s^{-1}$), R_R and R_G are respectively the radius of the rotational and the gyrational motions (in m), u_{ch} is the characteristic velocity (in $rev.m.s^{-1}$), N is the rotational speed of the drive shaft (in $rev.s^{-1}$) and Γ is the mixing torque (in N.m).

In practice, we use this planetary mixer to mix and develop flour-water batters (**Chapter 2A**). To check the validity of the calibration on flour doughs, we mixed a flour-water batter (500g flour + 500g water) at $N = 20-40-60-80-90-100-120$ rpm and $22^\circ C$. The same batter was sampled and placed in the rheometer equipped with the cone-and-plate geometry, at $22^\circ C$. Viscosity data of the batter obtained from the rheometer and from the mixer bowl P600 are presented in Fig. 2B.9. From rheometrical measurements, this batter can be considered as a shear-thinning fluid ($n = 0.53$ and $k = 32.01$). We can observe that

viscosity data obtained from the mixer bowl P600 are in agreement with those obtained from the conventional rheometer. Moreover, modified R_e numbers calculated from torque data recorded at $N = 20-40-60-80-90-100-120$ rpm were in the range of 1.4 and 10.6, showing that the batter mixing was still performed in the laminar regime. These results ascertain the reliability of the calibration and its usefulness for the mixing of flour-water batters.

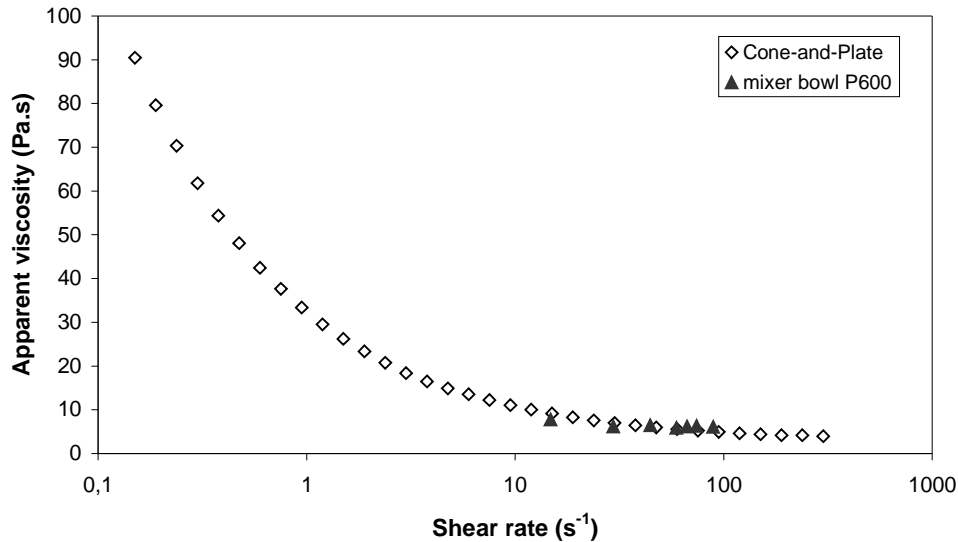


Fig. 2B.9: Viscosity data of a flour-water batter (100% hydration) obtained at 22°C from a conventional rheometer equipped with a cone-and-plate geometry and from the mixer bowl P600. Semi-log plot.

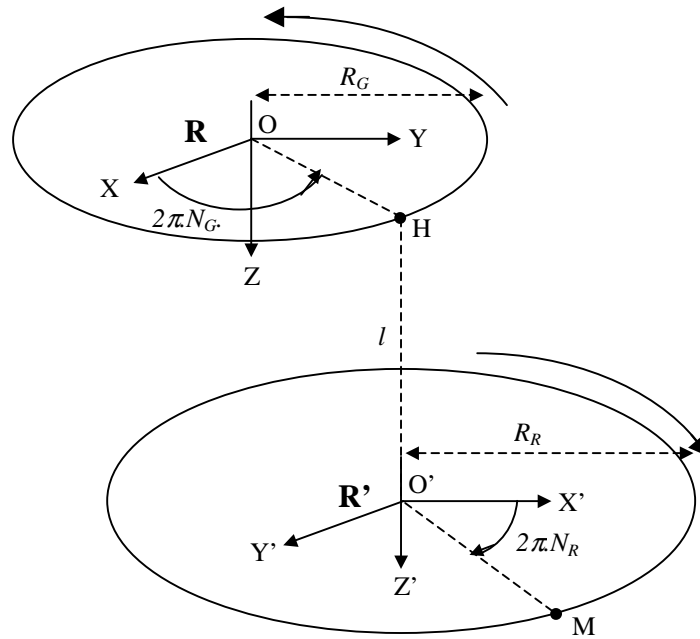
Moreover, we can observe in Fig. 2B.9 that mixing speeds of the mixer (N) ranging between 20 to 120 rpm correspond to shear rates ranging between 15 and 89 s^{-1} . These values are obviously average values encountered in the total volume of the fluid. In this range of shear rates obtained with the mixer bowl P600, we can also observe that the batter viscosity, ranging between 5 and 6 Pa.s, is quite stable in function of the shear rate. In a recent paper (**Chapter 2A**), we showed that batters of different varieties, mixed in the mixer bowl P600 at mixing speeds ranging between 80 and 100 rpm, can be considered as Newtonian fluids and not as shear-thinning fluids, as generally reported in the literature. We actually assume that mixing speeds N ranging between 80 and 100 rpm correspond to shear rates ranging between 59 and 74 s^{-1} . Fig. 2B.9 shows that the batter viscosity does not vary so much in this range of shear rates, thus explaining why we previously considered batters as pseudo-Newtonian fluids (**Chapter 2A**).

V. Conclusion

In this paper, we calibrated a particular planetary mixer we use to mix flour-water batters: the mixer bowl P600 (Brabender OHG, Germany), equipped with the helicoidal Kenwood stirring insert (Brabender OHG, Germany). We proposed a modified Reynolds number, a modified power number and mixer constants K_p and K_s for this mixer. This dimensional analysis allowed us to have an idea of shear rates (in s^{-1}) and batter viscosities (in Pa.s) encountered in our mixing device. This calibration will be useful to study the batter development during mixing by plotting the evolution of the batter viscosity (in Pa.s) in function of mixing time. However, the shear rate value obtained must be considered as a mean value and does not correspond to the real shear rate encountered on the overall length and pathway of the hook. A precise modelisation of the mixer should be done to draw the tridimensional cartography of shear rates.

VI. Appendices

Appendix 2B.I:



Considering M to be a point located at the impeller tip, the instantaneous position of M in the fixed reference frame R (0, \vec{X} , \vec{Y} , \vec{Z}) is given by:

$$\overrightarrow{(OM)}_R = \overrightarrow{OH} + \overrightarrow{HO'} + \overrightarrow{O'M}$$

$$\overrightarrow{(OH)}_R = \begin{pmatrix} R_G \cdot \cos(2\pi \cdot N_G \cdot t) \\ R_G \cdot \sin(2\pi \cdot N_G \cdot t) \\ 0 \end{pmatrix} \quad \overrightarrow{(HO')}_R = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ l \end{pmatrix} \quad \overrightarrow{(O'M)}_R = \begin{pmatrix} R_R \cdot \sin(2\pi \cdot N_R \cdot t) \\ R_R \cdot \cos(2\pi \cdot N_R \cdot t) \\ 0 \end{pmatrix}$$

Therefore,

$$\overrightarrow{(OM)}_R = \begin{pmatrix} R_G \cdot \cos(2\pi \cdot N_G \cdot t) + R_R \cdot \sin(2\pi \cdot N_R \cdot t) \\ R_G \cdot \sin(2\pi \cdot N_G \cdot t) + R_R \cdot \cos(2\pi \cdot N_R \cdot t) \\ l \end{pmatrix}$$

Appendix 2B.II:

Considering M to be a point located at the impeller tip, the instantaneous velocity of M in the fixed reference frame R (O, \vec{X} , \vec{Y} , \vec{Z}) is given by:

$$\vec{v}_a = \left(\frac{d\vec{OM}}{dt} \right)_R = \left(\frac{d\vec{OH}}{dt} \right)_R + \left(\frac{d\vec{HO}'}{dt} \right)_R + \left(\frac{d\vec{O'M}}{dt} \right)_R$$

$$\left(\frac{d\vec{OH}}{dt} \right)_R = \begin{vmatrix} -2\pi.RG.NG \sin(2\pi.NG.t) \\ 2\pi.RG.NG \cos(2\pi.NG.t) \\ 0 \end{vmatrix} \quad \left(\frac{d\vec{HO}'}{dt} \right)_R = \begin{vmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{vmatrix}$$

$$\left(\frac{d\vec{O'M}}{dt} \right)_R = \begin{vmatrix} 2\pi.RR.NR \cos(2\pi.NR.t) \\ -2\pi.RR.NR \sin(2\pi.NR.t) \\ 0 \end{vmatrix}$$

Therefore, the instantaneous velocity of M in the inert reference frame R (O, \vec{X} , \vec{Y} , \vec{Z}) is given by:

$$\left(\frac{d\vec{OM}}{dt} \right)_R = \begin{vmatrix} -2\pi.RG.NG \sin(2\pi.NG.t) + 2\pi.RR.NR \cos(2\pi.NR.t) \\ 2\pi.RG.NG \cos(2\pi.NG.t) - 2\pi.RR.NR \sin(2\pi.NR.t) \\ 0 \end{vmatrix}$$

Hence, the magnitude of instantaneous velocity of M is given by:

$$\|\vec{v}_a\| = u_{impeller\ tip}(t) = \sqrt{(2\pi.RG.NG)^2 + (2\pi.RR.NR)^2 - 2.(2\pi)^2.RG.RR.NG.NR.\sin(NG.t + NR.t)}$$

Appendix 2B.III:

It can be shown that maximum values of the function $t \mapsto u_{impeller\ tip}(t)$ is obtained when $\sin(2\pi.NG.t + 2\pi.NR.t)$ is equal to (-1).

In this case, $u_{impeller\ tip\ max}(t) = (2\pi.NG.RG + 2\pi.NR.RR)$

Consequently, $u_{ch} = \frac{u_{impeller\ tip\ max}(t)}{\pi} = N_G.d_G + N_R.d_R$

RESUME/CONCLUSION

Cette étude montre qu'il est possible de calibrer un pétrin planétaire de géométrie complexe et d'exprimer ainsi une viscosité de la pâte en Pa.s et une vitesse de cisaillement moyenne en s^{-1} . Pour cela, les facteurs de conversion propres au pétrin P600, équipé de la pale hélicoïdale, sont $K_p = 27.85$ et $K_s = 4.94$. L'application de tels facteurs permet de suggérer que les vitesses de pétrissage utilisées dans le **Chapitre 2A**, à savoir $N = 80, 90$ et 100 rpm, correspondent à des vitesses de cisaillement de l'ordre de $59, 67$ et $74 s^{-1}$. A ces vitesses, les valeurs de couple obtenues dans le **Chapitre 2A** correspondent alors à des viscosités de base comprises entre 5 et 30 Pa.s. Il faut toutefois noter que les facteurs de conversion sont valables quand le pétrissage s'effectue dans le régime linéaire. Dans le cas du pétrin P600, le régime linéaire est assuré pour des valeurs de Re_M inférieures à 10 .

De plus, cette étude montre que le pétrin P600 permet de mélanger la quasi-totalité de la pâte, à l'exception de la zone adjacente à la paroi du bol et de celle située au centre du bol. Cette étude confirme que la pâte est pétrie de façon transitoire dans le pétrin P600. La vitesse de cisaillement est la plus élevée au centre du pétrin, tandis qu'elle est la plus faible à proximité de la paroi du bol. De plus, l'amplitude de la nature transitoire du pétrissage augmente avec l'augmentation de la vitesse de pétrissage. Ceci n'est certainement pas sans conséquence sur le développement du réseau de gluten, et la nature transitoire du mouvement planétaire doit faciliter grandement la distribution des filaments de gluten observés dans le **Chapitre 2A** au sein de la pâte. Cette étude montre enfin que deux rotations du bras central ($2N$) sont nécessaires pour assurer le mouvement complet de la pale au sein du bol.

Pour conclure, la géométrie du pétrin P600 apparaît comme un paramètre important du pétrissage et détermine en grande partie son efficacité dans le cas du mélange farine-eau, par la déformation transitoire qu'il procure. Dans le cas du P600, le développement optimal de la pâte est contrôlé paramétriquement par la puissance instantanée ($\Gamma_b.N$) (**Chapitre 2A**). Par la calibration effectuée, ce paramètre peut à présent s'exprimer (Eqs. 21-22) en fonction de la viscosité de la pâte et de la vitesse de cisaillement sous la forme:

$$\Gamma_b.N = (K_p.d_G^3 / 2\pi.K_s^2).(\eta_b.\dot{\gamma}^2). \quad (23)$$

Cette équation fait apparaître un terme en $\dot{\gamma}^2$ qui suggère un rôle important des collisions dans l'agglomération du gluten. La démarche de calibration ainsi proposée s'avère être un outil très intéressant pour dimensionner, demain, d'autres pétrins en fonction des vitesses de cisaillement que l'on souhaite imposer.

CHAPITRE 3

EXTRACTION ET QUALITE DU GLUTEN EXTRAIT A L'OPTIMUM DE PETRISSAGE

Chapitre 3A – Influence du pétrissage sur le rendement d'extraction et la composition du gluten à t_{peak}

OBJECTIF

Dans le **Chapitre 2A**, nous avons montré qu'au sein d'une pâte diluée, pétrie à l'optimum de pétrissage (t_{peak}), la phase gluten se trouve en totalité constituée de filaments protéiques, tandis qu'elle est constituée d'agrégats protéiques durant tout le sous-pétrissage. Cet état de structure très particulier à t_{peak} nous a conduit à supposer que l'agglomération des protéines du gluten serait maximale à t_{peak} . Au cours du présent chapitre, nous proposons de vérifier cette hypothèse en mesurant le degré d'agglomération du gluten à t_{peak} . Pour cela, le gluten sera extrait d'une pâte diluée à t_{peak} en utilisant des conditions de lavage de la pâte et de tamisage du gluten très douces pour ne pas altérer le réseau de gluten formé par l'opération de pétrissage. Le degré d'agglomération du gluten sera évalué par la distribution du gluten sur trois tamis d'extraction et par la mesure du rendement d'extraction protéique.

De plus, nous avons montré, dans le **Chapitre 2A**, que les procédés de pétrissage (vitesse et hydratation) et la variété de farine utilisée influencent énormément les valeurs de t_{peak} . En est-il autant pour le rendement d'extraction et la composition du gluten à t_{peak} ? En d'autres termes, est-ce qu'un gluten extrait d'une pâte développée qui a nécessité 100 min de pétrissage pour atteindre t_{peak} est identique au gluten extrait d'une pâte développée plus concentrée n'ayant nécessité que 20 min de pétrissage ? Y a-t-il un effet procédé et un effet variétal, et quels sont-ils ? Ces différentes questions sont à la base du présent chapitre. En effet, celui-ci a également pour objectif de déterminer l'influence des procédés du pétrissage et de la variété de farine utilisée sur le degré d'agglomération et la composition du gluten extrait de la pâte à t_{peak} . Pour cela, le gluten sera systématiquement extrait de chacune des pâtes obtenues à t_{peak} dans le **Chapitre 2A**.

Publication n°3 - Influence of mixing on gluten protein recovery and composition. I. Extraction from optimally developed batters*

Abstract

Gluten and starch were extracted using a flour batter process, which included three successive steps: mixing, washing and sieving. In order to reveal the specific influence of the mixing step, a standardized gentle washing and sieving procedure was selected. Batters were prepared from three wheat cultivars, at different mixing speeds (N) and different flour/water ratios. The batters were mixed up to their maximal consistency, also referred to as the point of optimal dough development, which is attained after a time called t_{peak} . Under such mixing conditions, t_{peak} was previously shown to range from 5 min to more than 100 min (**Chapter 2A**). Mixing the batters at t_{peak} guaranteed a high and stable gluten protein recovery (ca. 82%), irrespective of mixing speed and flour/water ratio used. SE-HPLC analysis of the proteins, from flours and batters sampled at t_{peak} , demonstrated that mixing led to the total breakdown of SDS-insoluble glutenin polymers. In contrast, a re-assembly of glutenin polymers occurred during gluten extraction. The purity of the gluten (expressed as protein content of the washed gluten and ranging from 35-60%) was found to be related to the amount of SDS-insoluble glutenin polymers in the gluten and to the disulfide content of the gluten. We propose that the leaching of starch from the batter during gluten extraction is controlled by the elasticity of the protein network, which would be in turn determined by the SDS-insoluble glutenin content of the gluten. We saw that the number of mixing rotations ($N.t_{peak}$) required to attain optimal batter development depends on the mixing conditions (i.e. the combination of mixing speed and flour/water ratio). The gluten purity and the extent of glutenin re-assembly during extraction were strongly related to this number of mixing rotations, and not so much to the mixing speed, the flour/water ratio or the mixing time on themselves. All these features led us to propose that during mixing, some of the disulfide groups involved in the intermolecular branching of glutenin chains became irreversibly oxidized by oxygen reactive species, in a $N.t_{peak}$ dependent manner.

*Auger, F., Morel, M.H., Dewilde, M., Redl, A. *In preparation*.

I. Introduction

Gluten is the most important co-product of the wheat starch industry. This protein-enriched fraction, insoluble in water, is mainly composed of the major wheat storage proteins, gliadin and glutenin, which represent 80-85% of total wheat proteins (Pomeranz, 1988). Upon hydration and mixing of the wheat flour, gluten proteins agglomerate to form a strong, cohesive and viscoelastic network responsible for dough development (Campos et al., 1997). This unique characteristic of the vital gluten is useful in breadmaking, where gluten finds its major application as a flour fortification additive.

Separation of wheat flour into vital gluten and starch is a very ancient practice, which has been continuously modified all along the last century (Anderson et al., 1958; Robertson and Cao, 1998). Nevertheless, the state of the art in this industry remains largely empirical and relies on a multiplicity of laboratory and industrial processes (van der Borghet et al., 2005). Moreover, the efficiency of some applied processes still remains very sensitive to wheat cultivar and variations in crop quality (Anderson et al., 1960; Sindic et al., 1993; Roels et al., 1998). Nowadays, vital gluten is mainly extracted industrially by the batter process and all its derivatives (Roels et al., 1998). The process involves three successive steps: mixing, washing and separation. At first, flour is mixed with water using water/flour ratios between 0.7 and 1.8 (Anderson et al., 1958) to give a batter. During mixing, process parameters may be adjusted to promote or not gluten network development. Open literature is very scarce and diffused on this subject but we can identify three main types of technology. In the conventional batter process, the flour-water blend is mixed until the optimal gluten network development, leading to an elastic, but free-flowing, smooth batter (Hilbert et al., 1944; Rist, 1949; Anderson et al., 1958, 1960). In other batter-based processes, such as the Fesca and Raisio processes, the flour-water blend is mixed rapidly to give a slurry, without gluten network development (Johnston and Fellers, 1971; Fellers, 1973; Knight and Olson, 1984). Finally, in the so-called dough-batter process, flour is mixed at low water content to form a stiff “bread” dough which is then dispersed, by dilution with extra water under continuous mixing, to give a slurry (Hamer et al., 1989; Sindic et al., 1993, Roels et al., 1998; Frederix et al., 2004).

The batter, formed after one of these mixing processes, is then broken up mechanically during the washing step. A large amount of additional water is added and the suspension is mixed to produce gluten lumps (Anderson et al., 1958). Finally, the gluten/starch separation is

performed using gyrating sieves, vibrating sieves, centrifuges, decanters or hydrocyclones (Anderson et al., 1958, 1960; Fellers, 1973; Meuser et al., 1989; Sindic et al., 1993).

As reported above, the first mixing step can promote gluten network development or not, and this is likely to influence the final gluten protein recovery. On the other hand, the diluting and washing step was also reported to promote gluten agglomeration (Wang et al., 2004) but the inverse could not be totally excluded. In fact, each of the three steps might contribute to the efficiency of the gluten/starch separation. Due to the complexity of the batter processes, it remains difficult to assess the specific influence of the setting variables of the first mixing step. Recently, using a dough-batter process, Frederix et al. (2004) studied the influence of mixing parameters on gluten recovery and purity. They showed that increasing dough water content, mixing speed and mixing time increased the gluten yield. However, their main conclusion was that the mixing variables acted on gluten recovery only through the degree of dough development they promoted. To gain insight into how the mixing process variables, i.e. mixing speed and batter water content, influence the gluten composition and recovery, we propose (i) to standardize the degree of dough development for all the mixing experiments and (ii) to use a simplified laboratory batter process in which the washing and separation steps will be kept as gentle as possible. The purpose of the latter is to preserve the state of gluten protein interactions obtained at the end of the mixing step.

In a recent paper (Auger et al., 2007), we already studied the influence of the mixing parameters on batter development, for three wheat cultivars. Batters were mixed using variable mixing speeds and flour/water ratios. The mixing time required for optimal batter development was found highly variable, according to the mixing variables but also to the wheat cultivars. The mixing torque curves showed a characteristic lag phase and we were able to relate the time to maximum consistency (t_{peak}) to the instantaneous mixing power delivered during this phase. In the present work, we study the recovery and composition of the extracted protein fraction (gluten) from these optimally mixed batters, using a simplified batter process. We standardized the washing and separation steps, keeping them as smooth and gentle as possible. Changes in protein molecular size distribution from the batters sampled at t_{peak} and the extracted gluten samples were assessed by SE-HPLC analyses. The equivalent protein disulfide content of the extracted gluten samples is also presented. These analyses allow us to propose a general mechanism accounting for the gluten network development during batter mixing.

II. Experimental

II.1. Flours

French commercial wheat grains (cvs. Orvantis, Caphorn and Isengrain, harvest 2004) were milled on a Bühler laboratory mill (MLU 202, Bühler, Switzerland) according to AACC (2000) method 26-31. Moisture and ash contents were determined according to AACC methods (44-15A, 08-01, respectively). A Brabender Farinograph with a 50-g flour sample was used according to AACC method 54-21 to determine Farinograph water absorption and mixing time. A Chopin Alveograph with a 250-g flour sample was used according to ICC Standard method No. 121 to determine W and P/L ratio. The protein content ($N \times 5.7$) was determined using Kjeldahl method. Some of the biochemical and technological characteristics of the flours are given in Table 3A.1.

Table 3A.1. Flour characteristics

Wheat cultivar	Extraction rate (%)	Dry matter (%)	Ash (% db)	Protein (% db)	Farinograph		Alveograph	
					Water absorption ^a (% wb)	Mixing time (min)	W^b (10^{-4} J)	P/L^b
Orvantis	71.08	85.35	0.41	10.75	58.0	1.9	227	0.97
Caphorn	71.69	84.73	0.46	10.32	57.8	1.9	309	1.77
Isengrain	72.92	85.16	0.44	10.09	55.6	1.7	217	1.10

^a 14% water basis

^b Chopin Alveograph parameter

II.2. Gluten isolation

Wheat gluten was extracted using a laboratory scale batter process. This process included the three successive conventional operations: mixing, washing and separation.

II.2.1. Mixing step

Flour-water blends were mixed at 25°C using a planetary mixer bowl P600 (Brabender OHG, Germany), as described in **Chapter 2A**. Total dough mass was 550 g and all ingredients were equilibrated at 25°C before mixing. Three levels of mixing speed (80, 90 and 100 rpm) and flour/water ratio [(1.04-1.09-1.14, wb) for Orvantis, (1.11-1.18-1.25, wb) for Caphorn and (1.30-1.34-1.39, wb) for Isengrain] were tested. Mixing was carried out until the torque reached its maximum level for a time referred to below as t_{peak} . The specific

mechanical energy (SME) required to attain t_{peak} was measured from mixing torque and speed data as reported and given in Auger et al. (2007). From triplicate runs of the central condition (90 rpm, medium flour/water ratio), standard deviation of t_{peak} was found to be less than 10%. Mixing times required to optimally develop flour-water batters from Orvantis, Caphorn and Isengrain are given in Table 3A.2, for the mixing speeds (N) and flour/water ratios (F/W ratios) studied.

Table 3A.2. Influence of mixing speed and flour/water (F/W) ratio on t_{peak} values for cultivars Orvantis, Caphorn and Isengrain

Flour	F/W ratio	t_{peak} (min)		
		80 rpm	90 rpm	100 rpm
Orvantis	1.14	8.5	6.0	5.1
	1.09	11.1	9.6	7.6
	1.04	24.3	16.4	11.5
	0.83	-	-	144
Caphorn	1.25	23.6	13.4	11.6
	1.18	28.7	21.7	16.4
	1.11	86.3	70.2	35.9
Isengrain	1.39	59.6	52.9	28.5
	1.34	86.1	67.6	42.7
	1.30	131.2	99.9	73.2

Orvantis presented the fastest dough development and was shown to be less sensitive to mixing parameters than Caphorn and Isengrain. Mixing curves were presented in a previous paper (**Chapter 2A**). An extra-experiment, presented in our previous paper, was performed on the cultivar Orvantis in order to cover, with this flour, the same range of mixing times as for Isengrain. For that, Orvantis was mixed at a lower F/W ratio (0.83) and 100 rpm, resulting in a t_{peak} value of 144 min (Table 3A.2).

To follow glutenin breakdown, portions of batters sampled at t_{peak} (2 g) were frozen immediately in liquid nitrogen, freeze-dried and ground into a powder before analysis.

II.2.2. Washing step

Optimally mixed batters at t_{peak} were diluted by adding 1000 ml of demineralized water equilibrated at 25°C. The dough hook was replaced by a flat beater (K-beater, Brabender OHG, Germany) and the suspension was stirred at 28 rpm for 10 min. Temperature was kept constant at 25°C. This procedure, which allows part of the starch to leach from the gluten network, was chosen as gentle as possible to not alter the gluten network optimally developed at t_{peak} .

II.2.3. Separation step

The gluten-starch suspension obtained after the washing step was then brought over vibrating sieves. The sieve shaker used was a Retsch sieve shaker AS 200 digit (Retsch GmbH & Co, Germany) with an electromagnetic drive and equipped with three stainless sieves with decreasing pore sizes (800 μm , 400 μm and 200 μm). The sieves used, with a diameter of 200 mm and a height of 50 mm (Retsch GmbH & Co, Germany), were covered by a wet sieving cover (Retsch GmbH & Co, Germany) connected to the tap water network. A flow rate of 2 000 mL/min was applied during 3 min to ensure the wet separation of gluten and starch. We observed that, whatever the mixing conditions used to attain optimal dough development, all the gluten mass was recovered on the largest sieve (800 μm). The gluten was rested during 30 min at ambient temperature before being frozen in a freezer at -20°C , lyophilised and ground into a powder. From the end of mixing and the deposit of gluten into the freezer, the global time of washing, sieving and resting was exactly the same for all the experiments (ca. 60 min).

II.3. Flour, dough and gluten protein size distribution by SE-HPLC

Extraction of proteins and SE-HPLC analysis were performed on flours, powdered freeze-dried batters sampled at t_{peak} and isolated gluten samples. The procedure was carried out as previously described by Morel et al. (2000) by performing two sequential extractions. The first with a 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing 1% SDS, and the second with the same buffer and a sonication step to disperse SDS-insoluble glutenin polymers. Supernatants obtained from these extractions were injected onto a size exclusion column TSK-G 4000-SW (Merck, France) (7.5 mm x 30 cm) equipped with a TSK 3000-SW (Merck, France) guard column (7.5 mm, 7.5 cm). SDS-insoluble glutenin polymers (F_i) content was obtained from the total area of the chromatogram of the second extract. The contents in the other protein fractions were obtained from the first extract profile: early-eluted fractions, $F1$ and $F2$, included SDS-soluble glutenin polymers (10^6 to $15 \cdot 10^4$ Mr); following fractions, $F3$ and $F4$, included mainly gliadin ($15 \cdot 10^4$ to $20 \cdot 10^3$ Mr); the last eluting fraction, $F5$, included mainly albumin and globulin. The area under the peak corresponding to each fraction was expressed in % of total protein, estimated from the sum of the total areas under the chromatograms of the two extracts, once corrected for their different solid-to-solvent ratios (Morel and Bar-L'Helgouac'h, 2000).

II.4. Dosage of gluten disulfide groups

Dosage of the disulfide groups of protein was performed on powdered freeze-dried gluten samples, as previously reported by Morel et al. (2002). Briefly, triplicate samples (30 mg) were exhaustively reduced in Eppendorf tubes with 0.3 mL of buffer A (dithioerythritol 20 mM, Tris/HCl 80 mM, pH 8.5) for 1h at 60°C with intermittent vortexing. Tubes were sealed under argon and the reducing buffer was extensively degassed before use. To assess the accessible protein free thiol groups, a blank sample was prepared in the same conditions, except for the omission of dithioerythritol (DTE). These accessible thiol groups represented less than 8% of the total thiol equivalent groups measured after gluten reduction with DTE.

Samples were precipitated twice with 1.6 mL of glacial acetone including 100 mM acetic acid (to prevent thiol reoxidation). The final pellet was suspended in 1.6 mL of buffer B (propan-2-ol 50%, Tris HCl 80 mM, pH 8.5, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 0.4 mg/mL) under argon. After 15 min of vortexing and centrifugation, absorption by the nitrothiobenzoate anion (NTB⁻) was measured at 412 nm. Optical density was converted into reducing thiol equivalents using an ϵ value of 13,600 M⁻¹.cm⁻¹ for NTB⁻. The contribution of the gluten free thiol groups (blank sample) was subtracted, and the results from the triplicate DTE reduced samples were expressed in disulfide equivalent groups per gram of gluten protein. The variability from triplicate measurements was below 2.5%. Batches of eight gluten samples picked at random were analysed at once and variation from batch to batch was below 5%.

II.5. Gluten protein content

Gluten protein content ($N \times 5.7$) was determined using Kjeldahl method. The coefficient of variation of the analysis was less than 1% for the gluten samples. Following definitions were used:

Gluten protein content (GPC): mass percent of dry gluten. The GPC is used as a measure of the purity of gluten samples in proteins.

$$GPC = \frac{m_{\text{prot gluten}}}{m_{\text{gluten}}} \times 100 \quad (1)$$

Gluten protein recovery (GPR): mass percent of the flour protein (db). The GPR is used as a measure of the flour protein extraction yield.

$$\text{GPR} = \frac{m_{\text{prot gluten}}}{m_{\text{prot flour}}} \times 100 \quad (2)$$

Glutenin recovery (Glu Rec): mass percent of the flour glutenin recovered in gluten (db). Glutenin content was estimated from the sum of fractions F_i , $F1$ and $F2$ (see part II.3).

$$\text{Glu Rec} = \frac{\% (F_i + F1 + F2)_{\text{gluten}} \times m_{\text{prot gluten}}}{\% (F_i + F1 + F2)_{\text{flour}} \times m_{\text{prot flour}}} \times 100 \quad (3)$$

Gliadin recovery (Gli Rec): mass percent of the flour gliadin recovered in gluten (db). Gliadin content was estimated from the sum of fractions $F3$ and $F4$ (see part II.3).

$$\text{Gli Rec} = \frac{\% (F3 + F4)_{\text{gluten}} \times m_{\text{prot gluten}}}{\% (F3 + F4)_{\text{flour}} \times m_{\text{prot flour}}} \times 100 \quad (4)$$

Albumin/Globulin recovery (Alb/Glo Rec): mass percent of the flour albumin/globulin recovered in gluten (db). Albumin/globulin content was estimated from the fraction $F5$ (see part II.3).

$$\text{Alb/Glo Rec} = \frac{\% (F5)_{\text{gluten}} \times m_{\text{prot gluten}}}{\% (F5)_{\text{flour}} \times m_{\text{prot flour}}} \times 100 \quad (5)$$

III. Results

III.1. SDS-insoluble glutenin content of flours and optimally mixed batters

The amount of SDS-soluble and SDS-insoluble glutenin in flours and optimally mixed batters are presented in Fig. 3A.1. For each cultivar, data are mean values calculated from all the optimally mixed batters (9 samples) and error bars are for the standard deviations (Fig. 3A.1b). Flours presented large variations in their SDS-insoluble glutenin (F_i) content with a F_i content of 15.8% for Orvantis, 19.4% for Caphorn and 22.3% for Isengrain (Fig. 3A.1a). Despite those flour differences, all batters immediately sampled at t_{peak} presented the same F_i content of ca. 3-4%, irrespective of the mixing speed, the F/W ratio, the wheat cultivar and the initial flour F_i content (Fig. 3A.1b). It suggests that mixing batters until t_{peak} induced the total

breakdown of SDS-insoluble glutenin polymers (F_i), which was balanced by the formation of SDS-soluble glutenin fractions ($F_1 + F_2$).

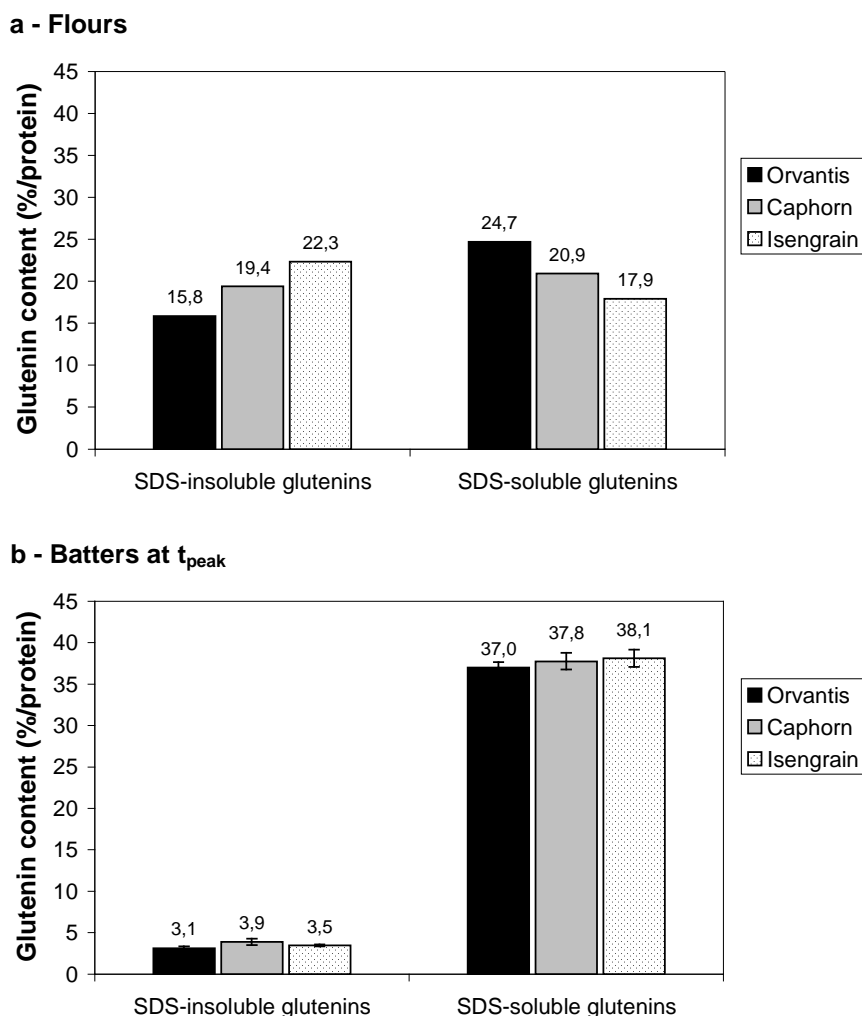


Figure 3A.1. Glutenin fractions content of (a) flours and (b) optimally mixed batters sampled at t_{peak} from Orvantis, Caphorn and Isengrain. For each cultivar, data at t_{peak} are mean values obtained from SE-HPLC analyses performed on all the optimally developed doughs mixed at 80, 90, 100 rpm for the variable flour/water ratios tested (see Table 3A.2). Error bars are coefficients of standard deviation calculated from all the experiments performed on each cultivar.

III.2. Gluten protein recovery

Gluten samples were extracted from all the batters mixed at t_{peak} . The mean values of gluten protein recovery (GPR) are presented in Table 3A.3, for the three cultivars. A same GPR value of ca. 82% was obtained at t_{peak} for all the gluten samples ($CV < 3\%$), whatever the mixing speed, the F/W ratio and the wheat cultivars used. Moreover, for all the batters, gluten was recovered as a compact mass on the sieve with the largest pore diameter size of

800 μm (not shown). Results showed that a similar and high value of protein recovery was guaranteed at t_{peak} , whatever the mixing speed and F/W ratio used.

Table 3A.3. Mean values of gluten protein recovery (GPR) and gluten protein content (GPC) from all the mixing experiments performed on cvs Orvantis, Caphorn and Isengrain

	GPR (%)			GPC (%)		
	Orvantis	Caphorn	Isengrain	Orvantis	Caphorn	Isengrain
mean	82.5	80.5	83.2	49.7	44.6	45.5
SD ^a	1.2	1.8	0.8	5.3	8.8	4.5
CV ^b	1.5	2.2	1.0	10.6	19.8	9.9

^a Standard deviation

^b Coefficient of variation

III.3. Gluten protein content

The mean values of gluten protein content (GPC) are presented in Table 3A.3. While the gluten protein recovery was stable for all the mixing experiments, we observed large variations in GPC ($CV > 10\%$). The statistical analysis, presented in Table 3A.4, showed that among the input and output mixing variables, t_{peak} gave the strongest significant correlation with GPC. Similar or even slightly stronger coefficients of correlation were also found for the mixing specific mechanical energy (SME) and the total number of mixing revolutions ($N.t_{peak}$). In the following, we will consider the latter variable to be the most relevant one for describing the variations in gluten protein content. Firstly, because it gives very consistent correlations within all the three cultivars and, secondly, because it is a more straightforward parameter than SME, which comprises the mixing time, speed and torque. $N.t_{peak}$ corresponds to the total number of mixing revolutions required to attain the optimal dough development and gives an estimate of the cumulative deformation experienced by the batter until peak development.

Table 3A.4. Coefficients of correlation between the protein content of extracted gluten (GPC) and mixing operating variables

	Gluten protein content (%)		
	Orvantis	Caphorn	Isengrain
Flour/water ratio	0.808**	0.849**	0.418
Mixing speed (N)	0.093	-0.264	-0.191
t_{peak}	0.869**	0.956**	0.533
$N.t_{peak}$	0.870**	0.970**	0.576
Mixing SME	0.855**	0.967**	0.724*

** $P < 1\%$, * $P < 5\%$

SME: Specific Mechanical Energy

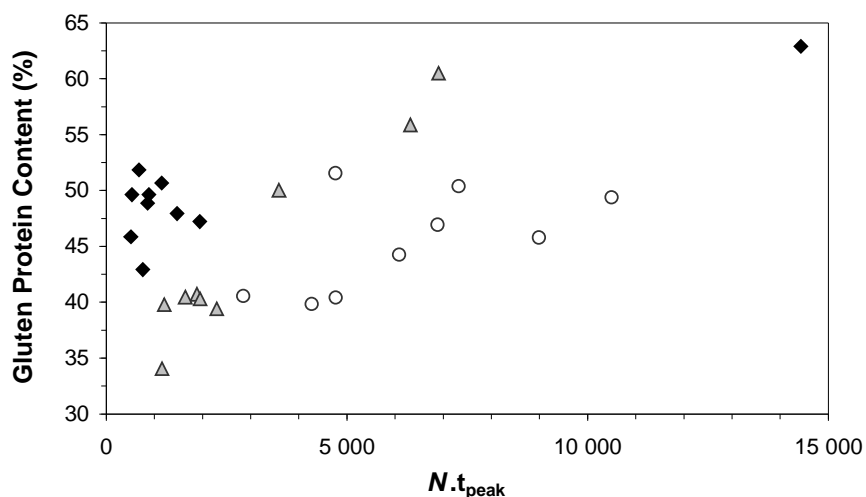


Figure 3A.2. Evolution of gluten protein content (GPC) in function of $N.t_{peak}$ for the cultivars (◆) Orvantis, (▲) Caphorn and (○) Isengrain.

The evolution of the GPC is plotted in function of $N.t_{peak}$ for the three cultivars, in Fig. 3A.2. The range of GPC was 34-61% for Caphorn, 41-53% for Isengrain and 46-52% for Orvantis. Gluten samples extracted with our laboratory batter process still contained a lot of starch and their GPC were outside the range of commercial glutes (> 75%). Nevertheless, the washing and sieving procedures were not chosen to obtain the purest gluten samples but to minimize gluten network damage. As a general trend, the gluten purity increased when increasing $N.t_{peak}$. This tendency, confirmed by the extra-experiment (at almost 15 000 $N.t_{peak}$) performed with Orvantis (Fig. 3A.2), suggests that starch escaped more easily from a batter that has suffered a larger cumulative deformation to attain the optimal dough development.

III.4. Glutenin, gliadin and albumin/globulin extraction recovery

Proteins of gluten samples were fractionated into the major protein groups (glutenin, gliadin and albumin/globulin) by SE-HPLC in order to calculate their respective recoveries (see parts II.3 and II.5). The mean values obtained for each protein group are presented in Table 3A.5. As a general trend, similar recoveries were obtained for all the cultivars: ca. 90% of glutenin, ca. 85% of gliadin and ca. 60% of albumin/globulin. The recovery decreased as the average molecular size of the protein class decreased and as the water solubility of the protein group increased. As already reported for the total gluten protein recovery, mixing parameters did not alter the recovery of each protein group (CV < 4%).

Table 3A.5. Mean values of glutenins, gliadins and albumins/globulins recovered in gluten samples extracted from the Orvantis, Caphorn and Isengrain batters.

	Glutenin recovery (%) ^a			Gliadin recovery (%) ^a			Albumin/Globulin recovery (%) ^a		
	Orvantis	Caphorn	Isengrain	Orvantis	Caphorn	Isengrain	Orvantis	Caphorn	Isengrain
mean	89.6	94.3	92.4	85.1	76.2	83.0	59.8	58.0	60.3
SD ^b	1.3	2.9	1.6	0.9	1.7	1.8	0.8	2.1	1.3
CV ^c	1.5	3.1	1.8	1.1	2.2	2.2	1.3	3.7	2.1

^a Glutenins = ($F_i+F_1+F_2$) fractions; Gliadins = (F_3+F_4) fractions; Albumins/Globulins = (F_5) fraction

^b Standard deviation

^c Coefficient of variation

III.5. SDS-insoluble glutenin content of gluten samples

The mean values of total and SDS-insoluble glutenin contents, in percentage of the total gluten protein, are given in Table 3A.6. Whereas the total glutenin contents ($F_i+F_1+F_2$) remained rather constant within each cultivar ($CV < 3\%$), large differences in SDS-insoluble glutenin polymers (F_i) existed ($CV > 17\%$). For all the mixing experiments, F_i content was larger in gluten than in the corresponding batter at t_{peak} , which means that F_i was reformed upon washing, sieving and resting. The statistical analysis, presented in Table 3A.7, showed that among the input and output mixing variables, t_{peak} gave the strongest significant correlation with gluten F_i content. As already found in the case of GPC variations, t_{peak} is a more relevant parameter than the mixing speed or the F/W ratio. Slightly stronger coefficients of correlation were found for SME and $N.t_{peak}$. In the following, we will consider the latter variable as the most relevant one for describing the variations in gluten F_i content, for the same reason as previously exposed for GPC.

Table 3A.6. Mean values of total glutenin content and SDS-insoluble glutenin content from gluten samples extracted from the Orvantis, Caphorn and Isengrain batters.

	Total glutenin content (%) ^a			SDS-insoluble glutenin content (%) ^b		
	Orvantis	Caphorn	Isengrain	Orvantis	Caphorn	Isengrain
mean	44.0	47.2	44.7	7.2	14.8	9.0
SD ^c	1.1	0.8	0.8	1.2	4.9	3.2
CV ^d	2.6	1.7	1.9	17.4	33.3	35.2

^a % ($F_i+F_1+F_2$) of total protein

^b % F_i of total protein

^c Standard deviation

^d Coefficient of variation

Table 3A.7. Coefficients of correlation between SDS-insoluble glutenin content of the extracted gluten samples and the mixing operating variables

	SDS-insoluble glutenin content (%)		
	Orvantis	Caphorn	Isengrain
Flour/water ratio	0.964**	-0.865**	-0.871**
Mixing speed (N)	-0.234	0.267	0.412
t_{peak}	-0.984**	-0.957**	-0.907**
$N.t_{peak}$	-0.981**	-0.979**	-0.949**
Mixing SME	-0.983**	-0.975**	-0.925**

** $P < 1\%$, * $P < 5\%$

SME: Specific Mechanical Energy

The evolution of gluten Fi content is plotted against $N.t_{peak}$ for the three cultivars in Fig. 3A.3a. The gluten Fi content ranged from 3.0% to 7.1% for the cultivar Orvantis and a larger range was observed for cultivars Caphorn and Isengrain (from 7.0% to 19.4% and from 5.1% to 13.4%, respectively). This result suggests that the SDS-soluble glutenin polymers, from optimally mixed batters, are able to re-assemble into SDS-insoluble polymers during the washing, sieving and resting steps. However, the extent of re-assembly was very variable among the samples.

A negative relationship between gluten Fi content and $N.t_{peak}$ was observed for Caphorn and Isengrain (Fig. 3A.3a), suggesting that high $N.t_{peak}$ values impaired the re-assembly of SDS-insoluble glutenin. At very high $N.t_{peak}$ values ($> 9\ 000$), values of Fi content of the gluten samples approached those of the corresponding batters (ca. 4%), indicating an almost total suppression of glutenin polymers re-assembly.

In contrast to Caphorn and Isengrain, all the gluten samples extracted from Orvantis presented a low Fi content, even at low $N.t_{peak}$ values (Fig. 3A.3a). However, Orvantis flour also contained a lower amount of SDS-insoluble glutenin (Fig. 3A.1a). To take into account the different protein composition of the cultivars, the gluten recovery in SDS-insoluble glutenin (gluten $FiRec$) was defined as follows:

$$Gluten\ FiRec = \frac{\left(\frac{mFi_{gluten} \times 100}{Glu\ Rec} \right)}{mFi_{flour}} \times 100 \quad (6)$$

where mFi_{gluten} is the mass (g) of Fi included in gluten, $Glu\ Rec$ is the glutenin recovery (%) presented in Table 3A.5 and mFi_{flour} is the mass (g) of Fi included in the flour mass of the batter.

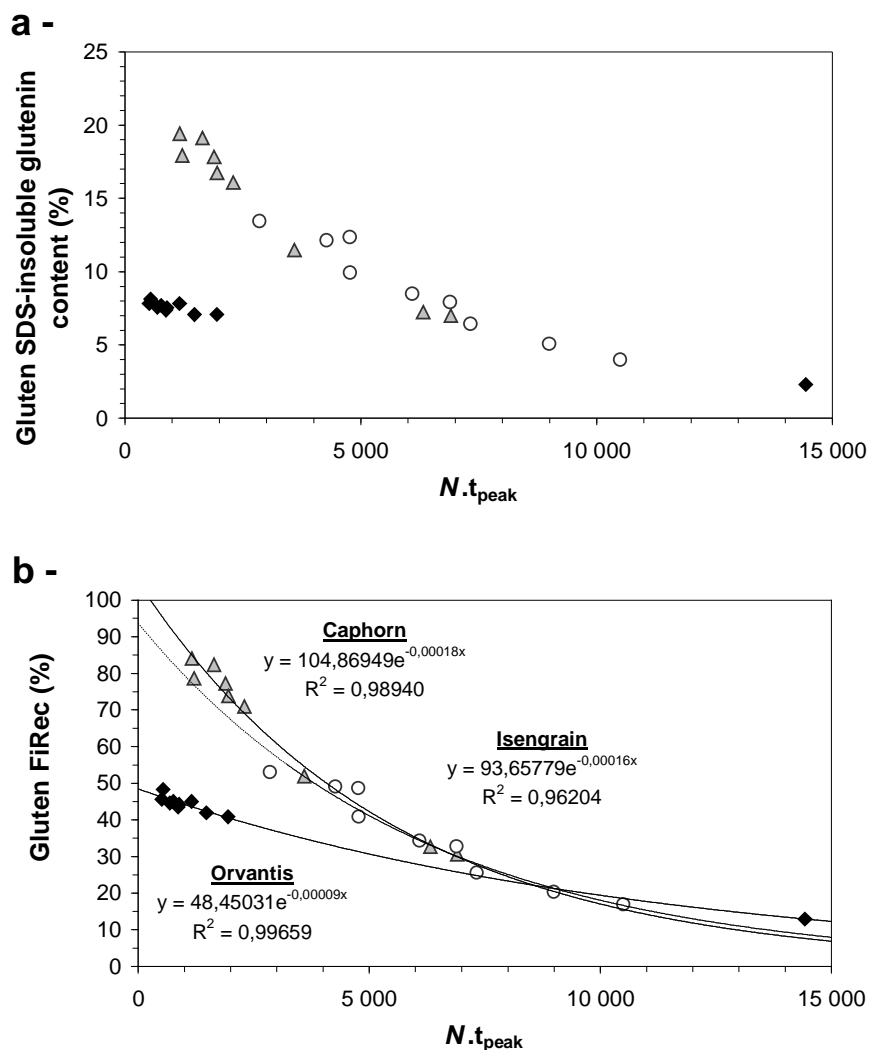


Figure 3A.3. Evolution of (a) gluten SDS-insoluble glutenin content and (b) gluten recovery in SDS-insoluble glutenin (gluten FiRec) in function of $N.t_{peak}$. Results from (♦) Orvantis, (▲) Caphorn and (○) Isengrain are presented. Data in Fig. 3A.3b are fitted by simple exponential.

The evolution of the gluten FiRec is plotted in function of $N.t_{peak}$ in Fig. 3A.3b. For all the cultivars, the gluten recovery in SDS-insoluble glutenin decreased when increasing $N.t_{peak}$, following an exponential decrease for the three cultivars. The exponential fitting (Fig. 3A.3b) confirmed a similar relationship for Caphorn and Isengrain. For these cultivars, the gluten FiRec tended towards ca. 100% when $N.t_{peak}$ tended towards 0, suggesting that the gluten recovery of SDS-insoluble glutenin would be not impaired for very low values of $N.t_{peak}$.

In contrast to Caphorn and Isengrain, the gluten FiRec for the cultivar Orvantis tended towards ca. 48% when $N.t_{peak}$ tended towards 0 (Fig. 3A.3b). This result suggests that 52% of the flour SDS-insoluble glutenin would never be recoverable in gluten. This loss of recovering capacity might be very rapid and could be more time dependent than $N.t_{peak}$ dependent (see the respective coefficients of correlation in Table 3A.7). Nevertheless, a

similar exponential decrease of gluten FiRec versus $N.t_{peak}$ was observed for the three cultivars (Fig. 3A.3b), suggesting that a similar mechanism preventing the reformation of SDS-insoluble glutenin in gluten occurred for the three cultivars. However, while Caphorn and Isengrain presented a same exponential factor of ca. -0.0002 , Orvantis presented an exponential factor of ca. -0.0001 , twice lower than those of Caphorn and Isengrain (Fig.3A.3b). This result suggests that, for Orvantis, the 48% recoverable Fi fraction was less sensitive to $N.t_{peak}$ than the two other cultivars. So, we may conclude (i) that the re-assembly mechanism is altered by the cumulative dough deformation in a similar way for the three cultivars, but with some different effectiveness, and (ii) that Orvantis is a particular cultivar presenting a prompt and irreversible loss of 52% of the Fi fraction present in the flour.

III.6. Gluten disulfide content

Due to their similar recoveries in terms of flour protein classes, all the gluten samples were expected to give similar equivalent disulfide contents, on a protein basis. On average, gluten samples showed 70.36 ± 4.1 ($\mu\text{moles/g prot}$) of equivalent disulfide bonds, with minimal and maximal values ranging from 58.45 to 75.93 $\mu\text{moles/g prot}$ (Table 3A.8).

Table 3A.8. Disulfide bonds content of the extracted gluten samples and relationship with mixing operating variables

	Gluten disulfide content ($\mu\text{moles/g prot}$)		
	Orvantis	Caphorn	Isengrain
max	73.51	75.93	74.71
min	58.45	63.90	64.02
mean	69.86	71.53	69.62
CV	6.24	6.01	5.68
Analysis of correlations			
	Orvantis	Caphorn	Isengrain
Flour/water ratio	-0.51	0.11	-0.01
Mixing speed (N)	-0.53	-0.82**	0.13
t_{peak}	-0.91**	0.68	-0.29
$N.t_{peak}$	-0.91**	-0.97**	-0.25
Mixing SME	-0.92**	-0.94**	-0.20

** $P < 1\%$, * $P < 5\%$

SME: Specific Mechanical Energy

The statistical analysis reported in Table 3A.8 revealed that mixing conditions significantly impacted on gluten equivalent disulfide bonds, at least for Caphorn and Orvantis. Higher mixing speeds and mixing times, and furthermore higher mixing SME and $N.t_{peak}$,

tended to depress the total disulfide equivalents accessible after protein reduction with DTE. This feature suggests an irreversible oxidation of some of the thiol groups normally involved in disulfide bonds. During mixing, thiol/disulfide exchange or disulfide homolytic cleavage could occur. The newly exposed thiol groups might suffer an irreversible oxidation leading to the formation of non-reducible thiol groups. Formation of sulfinic and sulfonic groups, or covalent coupling with α,β unsaturated carbonyls, is conceivable if we admit that batter includes reactive oxygen species (ROS) able to complex with ionized thiol groups or thiyl radicals (Schroeder and Hosoney, 1978; Sidhu et al., 1980; Rebello and Schaich, 1999; Morel et al., 2002; Hosoney, 1992).

IV. Discussion

Recently, we reported (**Chapter 2A**) that variation in mixing parameters (speed and F/W ratio) and wheat cultivars considerably affected the time required for optimal batter development (Table 3A.2). The present results showed that mixing parameters affected the composition (GPC and Fi content) but not the protein recovery of gluten samples extracted from the optimally developed batters. Variations in glutenin size distribution and gluten purity were related to t_{peak} , besides to the mixing speed or F/W ratio. An even better relation was found with the number of mixing revolutions required to attain the optimal dough development ($N.t_{peak}$). This result highlights the importance of the mixing history on the gluten/starch separation process, even starting from “similar” optimally developed batters.

Despite large differences in mixing times, all the optimally mixed batters showed the same protein size distribution at t_{peak} . The constant Fi value of ca. 3-4% in batters is in agreement with the value of 3% reported by Aït-Kaddour et al. (2007) for a bread dough mixed at peak development in a planetary mixer (Mahot, France). Breakdown of flour SDS-insoluble glutenin polymers during bread dough mixing in Farinograph or Mixograph, is also well documented (Mecham et al., 1962; Graveland, 1984; Weegels et al., 1995; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001; Don et al., 2003). An inferred conclusion might be that, irrespective of the mixer type, the F/W ratio or the mixing speed, the total breakdown of the flour SDS-insoluble glutenin content is required to get the optimal gluten network development. This assumption would explain why batters from the cultivar Orvantis required less time and energy to be optimally developed, compared to similar batters prepared from cultivars Isengrain or Caphorn (**Chapter 2A**). Indeed, the cultivar Orvantis presented the

lowest flour Fi content (15.8 % instead of 19.4 % and 22.3 % for Caphorn and Isengrain, respectively).

After the gentle washing and sieving procedure, about 82% of the flour proteins were recovered in gluten, in accordance with the maximal protein recoveries reported in literature (Anderson et al., 1960; Frederix et al., 2004). Nevertheless, extracted gluten samples included a more or less important quantity of starch, still embedded within the gluten matrix. The purest gluten samples were obtained from batters which have suffered the largest cumulative deformation before reaching peak development (Fig. 3A.2). This finding was revealed thanks to the standardized gentle washing and sieving procedure we chose to apply. In addition, the recovery in SDS-insoluble glutenin of the purest gluten samples was very low, suggesting an inverse relationship between gluten purity and gluten $FiRec$ (Fig. 3A.4). Starch granules would escape more easily from an optimally developed gluten network, which has lost its glutenin re-assembly capacity. Several studies reported that the plateau modulus G_N^0 of gluten, which can be a measure of the gluten elasticity, is positively correlated with its SDS-insoluble glutenin polymer content (Cornec et al., 1994; Popineau et al., 1994; Lefebvre et al., 2000). A strong elastic gluten network, characterized by a high $FiRec$, might prevent more efficiently the leaching out of starch than a less elastic one, characterized by a low $FiRec$.

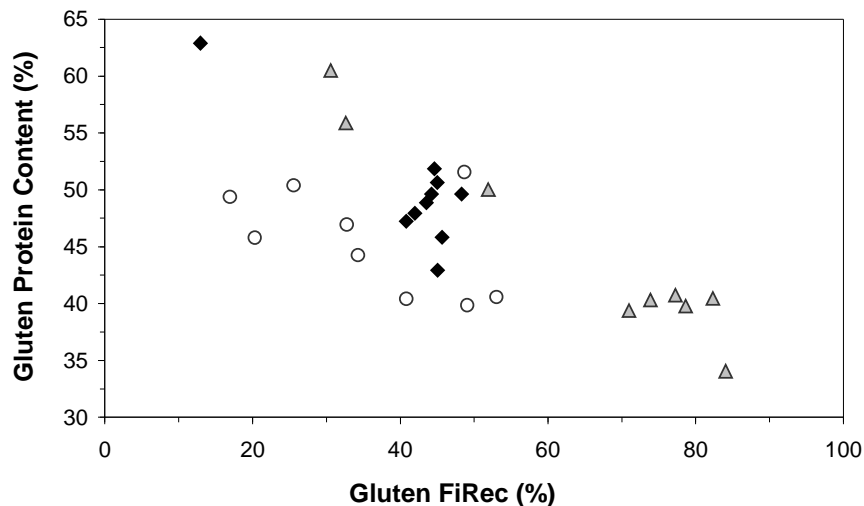


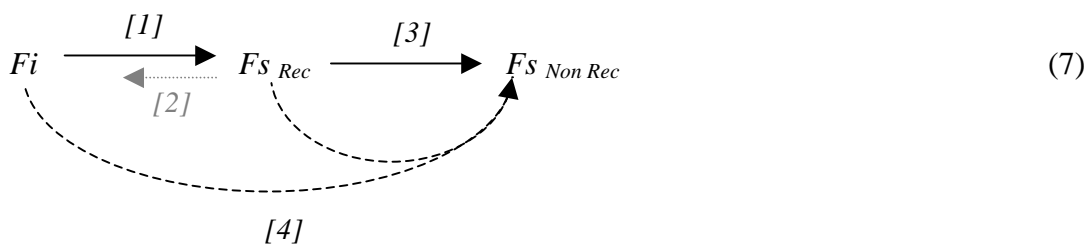
Figure 3A.4. Evolution of gluten protein content (GPC) in function of the gluten recovery in SDS-insoluble glutenin (gluten $FiRec$). Results from (◆) Orvantis, (▲) Caphorn and (○) Isengrain are presented.

While the mixing step induced the total breakdown of Fi fractions, the following washing, sieving and resting steps allowed the re-assembly of SDS-soluble glutenins. Such a re-assembly mechanism, occurring spontaneously when the mixing action is stopped, has been widely reported in literature (Weegels et al., 1995, 1997; Aussenac et al., 2001; Don et al., 2005b).

All the studies mentioned just above dealt with rested bread doughs, which required low cumulative deformation to be optimally developed (Haraszi et al., 2008). For bread dough mixed at t_{peak} , the re-assembly of SDS-insoluble glutenin polymers has been shown to be almost total ($> 80\%$) after 60 min rest (Weegels et al, 1997). This feature is coherent with the high Fi_{Rec} of gluten samples extracted from batters Caphorn and Isengrain developed at low $N.t_{peak}$ values (Fig. 3A.3b). In contrast, the drastic loss of Fi_{Rec} we observed for high $N.t_{peak}$ has been never reported for optimally developed bread doughs but can be connected to the specific behaviour of over-mixed bread doughs. Recently, Don et al. (2005) observed a lag-time in the re-assembly kinetics of SDS-insoluble glutenin polymers of several over-mixed bread doughs and observed that re-assembly was not total even after 90 min rest. They postulated that the SDS-insoluble glutenin recovery was negatively affected by the applied mixing energy. Our results show that $N.t_{peak}$ is more relevant than SME to account for gluten Fi_{Rec} loss. If we consider that this loss in re-assembly capacity is a distinctive feature of over-mixed bread doughs, batters mixed at high $N.t_{peak}$ should be viewed as over-mixed doughs as they just reached their optimal peak development.

A special behaviour was observed for Orvantis, where a large part (52%) of the SDS-insoluble glutenin polymers was never recovered in gluten samples, even for batters mixed at low $N.t_{peak}$. Orvantis might present a flour constituent, absent in Caphorn and Isengrain, which could induce an immediate loss of re-assembly capacity. However, the remaining 48% Fi fraction was always sensitive to $N.t_{peak}$ increase, as found for cultivars Caphorn and Isengrain (Fig. 3A.3b).

Taking together, these results might suggest the existence of recoverable and non-recoverable SDS-soluble glutenin polymers. We will define recoverable SDS-soluble glutenin polymers (Fs_{Rec}) as polymers able to re-assemble into SDS-insoluble glutenin polymers (Fi), whereas non-recoverable SDS-soluble glutenin polymers ($Fs_{Non Rec}$) do not have this capacity. In the following Eq. (7), we propose a general mechanism that could occur during the batter mixing to t_{peak} .



Where Fi are the SDS-insoluble glutenin polymers, Fs_{Rec} are the recoverable SDS-soluble glutenin polymers and $Fs_{Non Rec}$ are the non-recoverable SDS-soluble glutenin polymers.

The mechanism we propose implies four reactions that could be more or less prevalent in function of the mixing history and the wheat cultivar. Reactions [1] and [2] are the commonly known reactions of breakdown and re-assembly, widely reported in the literature (Don et al. 2005). Reaction [1] allows the total breakdown of large Fi fractions at t_{peak} to form Fs_{Rec} . This reaction is mechanically driven and requires mixing forces, such as shearing and elongation. Reaction [2] allows the re-assembly of Fi fractions from Fs_{Rec} . This reaction is known to occur spontaneously upon dough resting. However, reactions [1] and [2] cannot account for all the results presented in Fig. 3A.3b. This is why we introduced reactions [3] and [4].

Reaction [3] occurs for all the wheat cultivars and allows the formation of $Fs_{Non Rec}$ from Fs_{Rec} . We suggest that reaction [3], dependent on $N.t_{peak}$, could rely on the oxidation of thiol groups involved in the intermolecular branching of glutenin subunits. Supporting this hypothesis, we found that gluten $FiRec$ dropped linearly with the decrease of gluten equivalent disulfide content (Fig. 3A.5), at least for Caphorn glutes ($R^2 = 0.90$). The relationship was also significant for Orvantis glutes ($R^2 = 0.66, P < 5\%$) but not for Isengrain glutes. For Caphorn glutes, equivalent disulfide content dropped from 78 to 66 ($\mu\text{moles/g prot}$) as gluten $FiRec$ decreased from 84% to 30%. A relatively small decrease in equivalent disulfide bonds (12 $\mu\text{moles/g}$) led to a large decrease in gluten $FiRec$, i.e. to a large increase in SDS-soluble proteins. According to a theoretical calculation, Grosh and Wieser (1999) estimated that intermolecular disulfide bonds accounted for 9 $\mu\text{moles/g}$ of gluten proteins. Our results are within the range of these “rheologically active thiols”. The relationship between gluten equivalent disulfide content and gluten $FiRec$ confirms that $N.t_{peak}$ controls the irreversible thiol oxidation, in agreement with the previous statistical analysis (Table 3A.8). The result is logical if we remember that gas-transfer efficiency in mixed fluid is directly related to the dimensionless mixing time number, i.e. the time per number of mixing revolutions. Hence, the total amount of oxygen incorporated into the batter upon mixing will be proportional to $N.t_{peak}$.

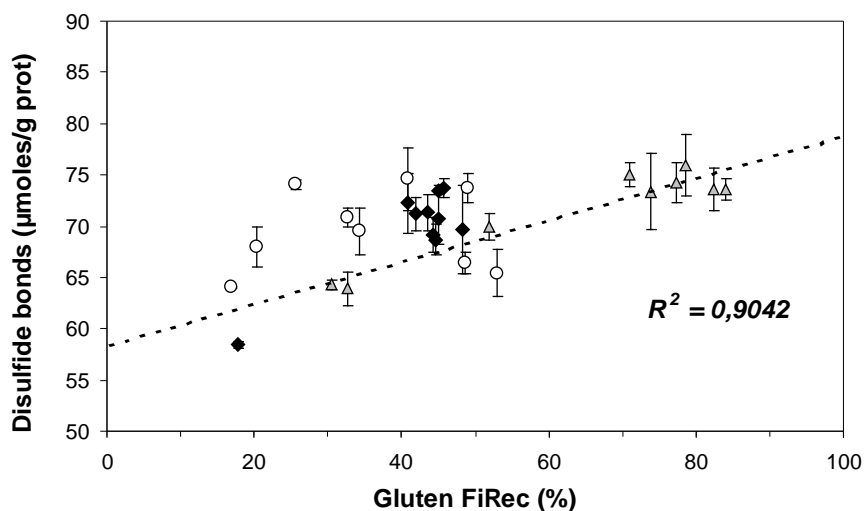


Fig. 3A.5. Evolution of gluten disulfide content in function of the gluten recovery in SDS-insoluble glutenin (gluten FiRec). Results from (◆) Orvantis, (▲) Caphorn and (○) Isengrain are presented. (---) linear regression line for Caphorn data.

Reaction [4] was introduced to account for the special behaviour of Orvantis. It might allow the formation of $Fs_{Non Rec}$ either from Fi or Fs_{Rec} . Actual results cannot allow us to specify this point. We cannot exclude that, compared to the two other flours, Orvantis would present a specific constituent implicated in reaction [4]. Reaction [4] occurs rapidly and might be chemically or enzymatically driven. It remains unclear whether reaction [4] involves or not the irreversible oxidation of some of the thiol groups engaged into disulfide bonds, like proposed for the reaction [3]. We can just underline that, for similar low $N.t_{peak}$ values (< 2 300), Orvantis glutes showed less equivalent disulfide bonds (71.12 ± 1.8 µmoles/g, 9 samples) than the corresponding Caphorn glutes (74.28 ± 1.0 µmoles/g, 6 samples). However, the two cultivars may also present different glutenin compositions and a comparative analysis of the glutenin from Orvantis flour and mixed batters would be needed to validate the hypothesis.

The reaction [4], specific of Orvantis, promoted a rapid conversion of SDS-insoluble glutenins into SDS-soluble ones. It might be the reason why, even at very low torque values, Orvantis batter developed so rapidly compared to batters from Caphorn and Isengrain, mixed at the same torque values (**Chapter 2A**).

V. Conclusion

In the present work, the efficiency of the gluten/starch separation was tested on optimally developed batters, for which the optimal dough consistency was obtained from very different combinations of mixing times, mixing speeds and flour/water ratios. Gluten samples were extracted from these batters by using a standard and gentle washing and sieving procedure. The gluten protein recovery always reached ca. 82%, whatever the mixing conditions used. The optimal degree of gluten network development guaranteed the stable extraction of gluten proteins on the largest sieve (800 μm) but also limited the leaching out of starch. The protein content of the extracted gluten samples, being comprised between 35% and 60%, remained far from the industrial expectations.

Gluten purity was found to be related to the gluten SDS-insoluble glutenin content. For batters developed at torque peak, almost all the flour SDS-insoluble glutenins were found being converted into SDS-soluble ones. During the washing and sieving steps, glutenin re-assembly occurred and variable amounts of SDS-insoluble glutenins were obtained in the extracted gluten samples. The gluten network elasticity, and thereby its ability to limit the leaching out of starch during the washing and sieving steps, would be related to the extent of glutenin re-assembly. The glutenin re-assembly capacity varied between the cultivars but, as a constant, was negatively impacted by the dimensionless mixing time number, $N.t_{peak}$. We proposed a general scheme accounting for the loss of glutenin re-assembly capacity in which the thiol groups, involved in the glutenin interchains bonds, became irreversibly oxidized upon mixing. Because the cumulative amount of oxygen incorporated into the dough should be proportional to $N.t_{peak}$, it was logical to found $N.t_{peak}$ as a relevant parameter of the irreversible oxidation of thiol groups.

When a high $N.t_{peak}$ was required to reach the peak development, a paradoxical situation was observed, where optimally mixed batters shared with over-mixed bread doughs the typical loss of glutenin re-assembly capacity. In bread dough, time to peak development (t_{peak}) was found to be rate-independent and described by $N.t_{peak}$ for different types of mixer (Haraszi et al., 2008). In batters, mixing requirement for optimal dough consistency was not rate-independent at all (**Chapter 2A**). Nevertheless, the present work suggests that the macromolecular structure of the glutenin polymers would be distinctly controlled by $N.t_{peak}$ whatever the dough water content, the state of gluten network development or the mixing device.

RESUME/CONCLUSION

Cette étude confirme que le réseau de gluten est bien développé de façon optimale à t_{peak} , quelles que soient les conditions de pétrissage utilisées. De plus, cette étude suggère que les polymères de gluténine de grande taille, insolubles dans le SDS (fraction Fi), jouent un rôle très important dans les mécanismes d'agglomération des protéines du gluten. La dépolymérisation totale de ces polymères de gluténine, se produisant au cours du pétrissage, serait d'ailleurs une condition nécessaire au développement optimal du réseau de gluten.

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de proposer un schéma général présentant trois voies de dépolymérisation des Fi possibles au cours du pétrissage. Outre le mécanisme traditionnel de dépolymérisation des Fi se produisant par hydratation et cisaillement de la pâte (réaction [1]), ce schéma général propose également deux mécanismes inédits qui empêchent la reformation des fractions Fi dans un gluten extrait à t_{peak} . Le premier (réaction [3]), qui est favorisé par des temps de mélange ($N.t_{peak}$) élevés, serait sous la dépendance de phénomènes d'oxydation irréversible des thiols impliqués dans l'association intermoléculaire des sous-unités de gluténine (HMW-GS et LMW-GS). Le second (réaction [4]), serait activé par la présence d'un catalyseur (agent chimique ou enzymatique) qui ne serait présent initialement que dans certaines farines, telle qu'Orvantis. Il n'est d'ailleurs pas exclu que ce même catalyseur puisse être formé au cours du pétrissage et que sa formation progressive soit finalement responsable de la réaction [3]. Ce point nécessite toutefois une étude plus approfondie. Il en est de même pour le schéma réactionnel proposé qui, n'étant établi qu'à t_{peak} dans ce chapitre, doit nécessairement être vérifié sur la totalité du pétrissage pour être validé.

Au cours de cette étude, la variété Orvantis s'est à nouveau distinguée des variétés Caphorn et Isengrain. D'une part, les conditions de pétrissage étudiées ont très peu affecté la composition biochimique des glutens Orvantis extraits à t_{peak} , tout comme les conditions de pétrissage avaient peu affecté les valeurs de t_{peak} (**Chapitre 2A**). D'autre part, Orvantis est la seule variété étudiée qui présente une perte irréversible des fractions Fi contenues dans sa farine. Ce phénomène, associé à la faible teneur en Fi de sa farine, suggère que la quantité de Fi à dépolymériser et les voies utilisés pour cela seraient responsables du temps de développement de la pâte. La validation du schéma général proposé dans cette étude reste toutefois indispensable.

Chapitre 3B – Caractérisation rhéologique de glutens extraits de pâtes pétries à t_{peak} selon différentes conditions de pétrissage

OBJECTIF

Précédemment (**Chapitre 3A**), nous avons montré comment l'historique du pétrissage et la variété de blé utilisée peuvent influencer grandement la composition biochimique d'un gluten extrait à t_{peak} , après un lavage doux et standard de la pâte. En faisant varier les conditions de pétrissage, nous avons obtenu des glutens présentant des teneurs en protéines variant de 35 à 75% et des teneurs en polymères de gluténine insolubles dans le SDS (fraction *Fi*) variant de 4 à 20%. Or, il est connu que ces polymères de gluténine influencent la qualité d'une farine (Weegels et al., 1996) ou la visco-élasticité d'un gluten (Cornec et al., 1994; Popineau et al., 1994; Lefebvre et al., 2000). Puisque la teneur en *Fi* des glutens est à présent maîtrisée, il serait intéressant d'étudier les propriétés rhéologiques des glutens obtenus. Cela permettrait ainsi de connaître l'influence du pétrissage à la fois sur la composition et sur la qualité du gluten extrait à t_{peak} .

De plus, nous avons fait l'hypothèse dans le **Chapitre 3A** que les glutens riches en fractions *Fi* seraient très élastiques et emprisonneraient plus efficacement l'amidon, ayant pour conséquence une teneur en protéines du gluten très faible. L'analyse rhéologique qui suit se focalisera donc plus spécifiquement sur l'influence des fractions *Fi* sur les propriétés élastiques du gluten de blé.

Publication n°4 - Influence of SDS-insoluble glutenin polymers on gluten elasticity for a constant glutenin to gliadin ratio*

Abstract

Dynamic oscillatory shear measurements were performed on several whole gluten samples to reveal the specific relationship between the gluten elasticity, measured by the height of the plateau modulus G_N° , and the gluten content in SDS-insoluble glutenin polymers. For that, 19 whole gluten samples extracted from three commercial wheat flours (Orvantis, Caphorn and Isengrain) using a laboratory batter process were purified to reach a similar protein content of around 81% for all the samples. SE-HPLC analyses showed that the gluten samples tested differed in their content in SDS-insoluble glutenin, while keeping the same proportion of glutenin, gliadin and albumin/globulin. This resulted in a constant glutenin to gliadin ratio for all the samples tested. Large differences in storage and loss moduli were observed between the gluten samples. Mechanical spectra were quantitatively analyzed applying the Cole-Cole procedure to extract the height of plateau modulus. A strong correlation was found between the plateau modulus and the gluten content in SDS-insoluble glutenin polymers. The relationship was confirmed by using three commercial gluten samples. The results reported the specific influence of SDS-insoluble glutenin polymers to gluten elasticity.

*Auger, F., Lefebvre, J., Redl, A., Morel, M.H., 2008. *In preparation.*

I. Introduction

Wheat gluten proteins mainly consist of gliadin and glutenin (Schofield, 1986). These proteins have different effects on the rheological properties of dough and gluten. Gliadin is essentially viscous, whilst glutenin imparts strength and elasticity (Orth and Bushuk, 1972; Huebner and Wall, 1976). Into gluten, the arrangement of glutenin and gliadin confers some remarkable viscoelastic properties to this raw material, being responsible for the uniqueness of wheat flour for breadmaking (MacRitchie, 1978; Tatham et al., 1985). However, the gluten structure that could explain the unique gluten viscoelasticity is still lacking today. A widely used approach is to consider the gluten phase as a continuum polymer network, which is stabilized by various interactions such as covalent bonds, noncovalent bonds or entanglements. According to the “loop-and-train” model proposed by Belton (1999), linear chains of glutenin polymers would interact with each other through a mechanism involving the creation and breakdown of numerous hydrogen bonds. In this model, gluten viscoelasticity would mainly result from the deformation of loops but also from the slippage of chains at the train location. Another model consists of describing the gluten phase as an entangled network of flexible polymers (Singh and MacRitchie, 2001). In this model, gluten viscoelasticity would mainly result from the slippage of chains through entanglements, while resistance to deformation would come from the numerous entanglements or cross-links. For Hamer and van Vliet (2000) and Lefebvre et al. (2003), gluten cannot be viewed as a continuum polymer network but as a transient network of glutenin particles. In their “hyper-aggregation” model, Hamer and van Vliet (2000) proposed a multi-scale model involving different levels of structure and different sub-models. For these authors, gluten viscoelasticity would be the result of multiple interactions occurring between the glutenin particles but also from all the other interactions occurring at the different sub-scales of the model.

Among the gluten proteins, glutenin is an extremely polydisperse group of polymers, with respect to size. The largest glutenin polymers, insoluble in sodium dodecyl sulfate (SDS) (Graveland, 1984), play an important role in governing the quality of flours for the breadmaking industry. In their study, Weegels et al. (1996) clearly reported that good breadmaking flours contained high amounts of SDS-insoluble glutenin, whilst poor breadmaking flours contained low amounts of this fraction. In a recent paper (**Chapter 3A**), we gave evidence that SDS-insoluble glutenin also acts on the efficiency of the gluten/starch separation process, by affecting gluten purity. When extracted from optimally developed batters, gluten samples containing high amounts of SDS-insoluble glutenin were shown to

contain more residual starch than gluten samples containing low amounts of SDS-insoluble glutenin. We suggested that gluten elasticity increased with its content in SDS-insoluble glutenin, and proposed that starch would escape more easily from a more viscous gluten network than from a more elastic one.

Cornec et al. (1994) already showed a strong relationship between gluten elasticity and its amount in the largest glutenin polymers. However, the relationship they found was based on gluten subfractions, which were prepared using sequential extraction with dilute HCl solutions. The sequential extraction used allowed them to enrich gluten subfractions in large glutenin polymers, but also affected the proportion of all the other protein groups, such as medium-size glutenin, gliadin and soluble protein. This resulted in considerable variations of the glutenin to gliadin ratio between the gluten subfractions. However, this ratio was shown by others (Khatkar et al., 1995; Janssen et al., 1996) to considerably affect gluten viscoelasticity. Popineau et al. (1994) extended the work of Cornec et al. (1994) using glutes extracted from three near-isogenic lines of wheat (cv. Sicco), which differed in high M_r glutenin subunits composition. Unfortunately, they used a similar acid sequential extraction to enlarge the number of gluten subfractions tested. This procedure could affect the quality of gluten proteins and led to the characterization of gluten samples that were very different from commercial glutes.

In a previous study (**Chapter 3A**), we were able to extract whole gluten samples presenting variable contents in SDS-insoluble glutenin, while keeping constant the proportion of glutenin, gliadin and soluble protein. These gluten samples were extracted from commercial wheat cultivars by using a simplified laboratory batter process, without acids or detergents that could affect the quality of gluten proteins. These gluten samples could be useful to reveal the specific influence of the SDS-insoluble glutenin on gluten viscoelasticity. However, these gluten samples still contained large amounts of starch and a purification procedure should be performed before rheological measurements.

In the present study, we extend the works of Cornec et al. (1994) and Popineau et al. (1994) to a higher number of whole gluten samples. The aim is to confirm that increasing only the content of SDS-insoluble glutenin in gluten increases its elasticity, while keeping constant the proportion of other protein groups. For that, small deformation dynamic rheological measurements were performed on several whole gluten samples that were extracted from optimally developed batters in **Chapter 3A**, purified and analyzed by SE-HPLC to determine their protein size distribution. Commercial gluten samples were also characterized to enlarge the studied range.

II. Experimental

II.1. Material

Gluten samples were extracted in a precedent study (**Chapter 3A**) from optimally developed batters of common wheat cultivars Orvantis, Caphorn and Isengrain. The procedure of gluten isolation was based on a laboratory batter process. These gluten samples differed in their SDS-insoluble glutenin content but also in their protein content, which varied from 35% to 65%. We selected 6 gluten samples from Orvantis, 7 from Caphorn and 6 from Isengrain to cover the largest range in SDS-insoluble glutenin content. The gluten samples were purified in order to get a similar protein content of about 80% for all the samples. The procedure used to purify and rehydrate the gluten samples is described in part II.2.

In complement, three commercial powdered gluten samples, which presented protein contents of about 75%, were kindly given by Tate & Lyle Co. to enlarge the studied range. Commercial gluten samples were rehydrated following the same procedure as performed for other gluten samples and described in part II.2.

II.2. Rehydration and preparation of gluten samples

Powdered gluten samples (0.7g of gluten proteins) were weighted in a centrifuge tube (50 mL). Distilled water (20 mL) at 20°C was added and the content of the tube was homogenized by vigorous vortex agitation. The tube was then placed on an orbital shaker (Reax 2, Heidolph Elektro GmbH & Co., Germany) operating at 40 rev.min⁻¹, and agitated for 15 min at 20°C. The suspension was subsequently sieved on a stainless sieve with 50 µm pore diameter size (Retsch GmbH & Co, Germany) to separate the gluten phase from starch. Gluten was recovered on the sieve manually. Part of the hydrated gluten (~1 g) was placed into the measuring system of the rheometer whereas rest was freeze-dried and ground into a powder for Kjeldhal and SE-HPLC analyses. The preparation and characterization of gluten samples were performed twice for each gluten sample.

II.3. Gluten protein content

Gluten protein content ($N \times 5.7$) was determined using the Kjeldahl method on powdered freeze-dried gluten samples after the purification procedure. The coefficient of variation of the analysis was less than 1% for the gluten samples.

II.4. SE-HPLC analyses

Extraction of proteins and SE-HPLC analysis were performed on powdered freeze-dried gluten samples after the purification procedure. The procedure was carried out as previously described by Morel et al. (2000) by performing two sequential extractions: A first one, with a 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing 1% SDS, and a second one, with the same buffer and a sonication step to disperse SDS-insoluble glutenin polymers. Supernatants obtained from these extractions were injected onto a size exclusion column TSK-G 4000-SW (Merck, France) (7.5 mm x 30 cm) equipped with a TSK 3000-SW (Merck, France) guard column (7.5 mm, 7.5 cm). SDS-insoluble glutenin polymers (F_i) content was obtained from the total area of the chromatogramme of the second extract. The contents in the other protein fractions were obtained from the first extract profile: early-eluted fractions, $F1$ and $F2$, included SDS-soluble glutenin polymers (10^6 to $15 \cdot 10^4$ Mr); following fractions, $F3$ and $F4$, included mainly gliadin ($15 \cdot 10^4$ to $20 \cdot 10^3$ Mr); the last eluting fraction, $F5$, included mainly albumin and globulin. The area under the peak corresponding to each fraction was expressed in % of total protein, estimated from the sum of the total areas under the chromatogrammes of the two extracts, once corrected for their different solid-to-solvent ratios (Morel and Bar-L'Helgouac'h, 2000).

II.5. Dynamic rheological analysis

Dynamic shear measurements were carried out at 25°C using a strain-controlled ARES rheometer (TA Instruments, USA) fitted with a cone-and-plate measuring geometry (cone diameter 25 mm, cone angle 0.1 radian, gap 46 μm). After gap setting, the gluten was covered with demineralized water to avoid drying. It was left to rest for 1h at 25°C before starting the dynamic measurements to allow dissipation of stress. Two mechanical spectra of each wheat gluten sample were recorded successively by decreasing the angular frequency from 100 to 0.01 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ and then increasing it back to 100 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. The ascending spectrum will be always taken as a basis for analyses. Dynamic measurements were performed at 1% strain amplitude, a range small enough to assume that the viscoelastic behaviour remained within the linear domain. Indeed, we checked that all the gluten samples behaved linearly for strain amplitude of at least 3% (*not shown*).

II.6. Analysis of mechanical spectra

The mechanical spectra were analyzed using the method proposed by Lefebvre et al. (1993, 2000, 2003) and applied by Cornec et al. (1994) and Redl et al. (1999). The mechanical spectra of gluten display a loss compliance peak in the upper region of the frequency window, indicative of a network type of structure. In the region of the peak, mechanical spectra expressed in terms of the storage compliance $J' = G'/(G'^2 + G''^2)$ and of the loss compliance $J'' = G''/(G'^2 + G''^2)$ can be fitted by the Cole-Cole model. The storage and the loss compliance functions of the Cole-Cole model, for a viscoelastic fluid, are:

$$J'(\omega) = J_g + (J_N^\circ - J_g) \frac{(\omega_b/\omega)^n + \cos(\pi n/2)}{(\omega_b/\omega)^n + 2\cos(\pi n/2) + (\omega/\omega_b)^n} \quad (1)$$

$$J''(\omega) = (J_N^\circ - J_g) \frac{\sin(\pi n/2)}{(\omega_b/\omega)^n + 2\cos(\pi n/2) + (\omega/\omega_b)^n} + \frac{1}{\omega \cdot \eta_0} \quad (2)$$

where J' and J'' are the storage and loss compliance, respectively; J_N° is the plateau compliance associated with the network density; ω_b is the angular frequency of the loss compliance peak and may be regarded as defining the boundary between the plateau and transition zones of the mechanical spectrum; n is the frequency spread parameter which measures the broadness of the loss peak; η_0 is the steady state Newtonian viscosity and J_g is the glassy compliance.

In fact, within the frequency window of the experiments, the glassy compliance J_g , for which the order of magnitude would be $10^{-9} \text{ m}^2/\text{N}$, makes an altogether negligible contribution to $J'(\omega)$ and $J''(\omega)$. Similarly, we can drop the contribution of flow, $1/\eta_0 \omega$, to the loss compliance since the steady state Newtonian viscosity η_0 of gluten is extremely high (*ca.* 10^8 Pa.s , Lefebvre et al., 2003). After these simplifications, Eqs. (1) and (2) can be combined to give:

$$J''(\omega) = \left(\frac{J_N^\circ}{2 \tan(\pi n/2)} \right) \times \left[\left(1 + 4 \frac{J'(\omega)}{J_N^\circ} \left(1 - \frac{J'(\omega)}{J_N^\circ} \right) \tan^2(\pi n/2) \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (3)$$

Eq. (3) is the equation of an arc of circle passing through the origin. The first step of the procedure consists in fitting Eq. (3), which contains only two adjustable parameters (J_N° and n), to the experimental data in the upper region of the frequency window. This gives the plateau compliance J_N° and the spread parameter n . The plateau modulus G_N° , which measures the network elasticity, is obtained simply as $G_N^\circ = 1/J_N^\circ$. Then, fitting Eqs (1) and (2) to the same data, with J_N° and n set to the obtained values, gives ω_b , the central frequency of the loss compliance peak.

III. Results and Discussion

III.1. Total protein content of gluten samples

After the purification procedure, all the 19 gluten samples presented very high values of protein contents (Table 3B.1). The mean value varied from 77.8 % for Orvantis gluten samples to 83.4 % for Caphorn gluten samples. Within each cultivar, the coefficient of variation for protein content was very low (< 4%). We can therefore consider that the protein content of all the gluten samples is similar and is about of 81%. This result shows that the purification procedure succeeded in obtaining standardized pure gluten samples, a preliminary requirement necessary to fulfill for their subsequent rheological comparison.

Table 3B.1. Total protein content of gluten samples after the purification procedure.

Wheat cultivar		Protein content (%)	<i>mean</i>	<i>CV*</i>	<i>min</i>	<i>max</i>
Orvantis	O1	81.00	<i>77.78</i>	<i>3.57</i>	<i>75.03</i>	<i>81.38</i>
	O2	81.38				
	O3	76.38				
	O4	77.43				
	O5	75.45				
	O6	75.03				
Caphorn	C1	86.65	<i>83.42</i>	<i>2.44</i>	<i>80.97</i>	<i>86.65</i>
	C2	85.48				
	C3	83.43				
	C4	83.49				
	C5	80.97				
	C6	82.10				
	C7	81.83				
Isengrain	I1	77.32	<i>81.21</i>	<i>3.40</i>	<i>77.32</i>	<i>84.98</i>
	I2	82.48				
	I3	78.96				
	I4	80.89				
	I5	84.98				
	I6	82.63				

* Coefficient of variation

III.2. Protein size distribution of gluten samples

The protein size distribution of the purified gluten samples is given in Table 3B.2. All the data are expressed in percent of the total proteins of the purified gluten samples.

Table 3B.2. Distribution of glutenin, gliadin and albumin/globulin in gluten samples after the purification procedure.

Wheat cultivar	Glutenin			Gliadin	Albumin/Globulin	
	SDS-insoluble <i>Fi</i>	SDS-soluble <i>F1+F2</i>	Total <i>Fi+F1+F2</i>	<i>F3+F4</i>	<i>F5</i>	
Orvantis	O1	4.56	44.90	49.46	41.33	9.21
	O2	5.38	44.67	50.05	40.99	8.96
	O3	12.95	37.12	50.07	40.28	9.65
	O4	13.88	35.68	49.56	41.56	8.88
	O5	16.47	33.76	50.23	40.55	9.23
	O6	17.22	33.25	50.47	40.27	9.27
	mean	11.74	38.23	49.97	40.83	9.20
CV*	46.70	13.76	0.78	1.34	2.94	
Caphorn	C1	8.21	42.87	51.08	39.50	9.42
	C2	10.38	42.51	52.89	38.22	8.89
	C3	17.91	34.59	52.50	37.92	9.58
	C4	18.39	36.15	54.54	35.93	9.53
	C5	20.78	32.72	53.50	36.76	9.75
	C6	22.27	30.76	53.03	37.43	9.54
	C7	23.11	28.49	51.60	38.68	9.72
mean	17.29	35.44	52.73	37.78	9.49	
CV*	33.62	15.63	2.19	3.17	3.02	
Isengrain	I1	7.49	41.05	48.54	41.83	9.63
	I2	18.30	34.22	52.52	38.12	9.36
	I3	18.86	33.23	52.09	38.37	9.54
	I4	22.60	28.04	50.64	39.96	9.40
	I5	24.30	29.01	53.31	37.17	9.52
	I6	26.57	26.04	52.61	37.66	9.73
	mean	19.69	31.93	51.62	38.85	9.53
CV*	34.35	17.07	3.39	4.48	1.45	

* Coefficient of variation

Within each cultivar, the respective proportion of glutenin (total), gliadin and albumin/globulin is comparable for all the gluten samples (CV < 5%). Gluten samples extracted from Caphorn and Isengrain displayed a very close composition, with about 52.2 % of glutenin, 38.3 % of gliadin and 9.5% of albumin/globulin. Gluten samples extracted from Orvantis showed only a slight difference in the proportion of glutenin and gliadin, with 50.0 % of glutenin and 40.8 % of gliadin. These distributions resulted in a mean glutenin to gliadin ratio of 1.22 for Orvantis, 1.39 for Caphorn and 1.33 for Isengrain. We think that it is allowed to consider that all the gluten samples showed comparable glutenin to gliadin ratios and similar distributions of their proteins between the glutenin, gliadin and soluble proteins classes.

While the proportion of glutenin was constant for all the gluten samples, large differences existed in their size distribution range (Table 3B.2). Gluten samples from Orvantis presented SDS-insoluble glutenin contents ranging from 4.6% to 17.2% of total protein. This range was even larger for the gluten samples isolated from Caphorn (from 8.2% to 23.1%) and Isengrain (from 7.5% to 26.6%). A larger range would not have been expected, as the maximal SDS-insoluble content of the parental flour was 22.3% for Isengrain (**Chapter 3A**).

The results confirm that we have obtained a set of whole gluten samples presenting an unique standardization of their protein composition: only the proportion of SDS-insoluble glutenin varied, while the proportion of total glutenin, gliadin and albumin/globulin and the protein content were kept constant.

III.3. Viscoelastic behaviour of gluten samples

Fig. 3B.1 gives as examples the mechanical spectra of the gluten samples Orvantis 1 (O1) and Isengrain 6 (I6) (see Table 3B.2). These gluten samples were chosen because of their contrasted content in SDS-insoluble glutenin: gluten O1 presented the lowest content in SDS-insoluble glutenin while gluten I6 presented the highest one, among the tested series (Table 3B.2). Both gluten samples presented a similar mechanical spectrum, as it was the case for all the other gluten samples tested (*not shown*). The spectra of all the gluten samples studied displayed the classical shape encountered for gluten in the literature (Cornec et al., 1994; Tsiami et al., 1997), which is characteristic of a transient network structure (Lefebvre et

al., 1993; 2000; 2003). In the experiments performed, the frequency window encompassed a section of the viscoelastic plateau approaching the transition zone of the spectrum.

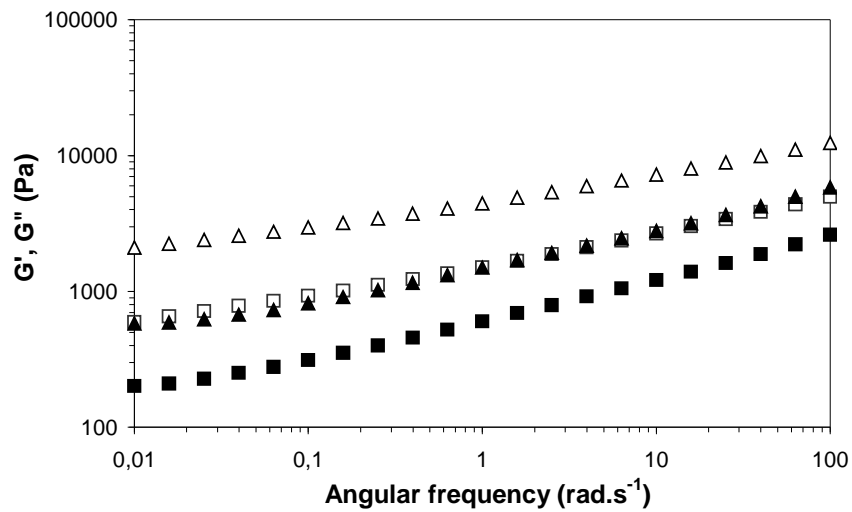


Fig. 3B.1. Mechanical spectra obtained at 25°C for the gluten samples (\square , G' ; \blacksquare , G'') Orvantis 6 and (\triangle , G' ; \blacktriangle , G'') Isengrain 1. See Table 3B.1.

While the mechanical spectra of gluten samples O1 and I6 were qualitatively similar, they differed widely in the magnitude of the moduli $G'(\omega)$ and $G''(\omega)$. The moduli were significantly higher for the gluten I6 than for the gluten O1. In Fig. 3B.2, $\tan \delta = G''/G'$, which is a measure of the ratio of energy lost to energy stored in a cycle of deformation, is plotted against the angular frequency. Whereas the two curves had exactly the same shape, gluten I6 displayed lower $\tan \delta$ values than gluten O1, and thus at all the frequencies studied in the experimental window.

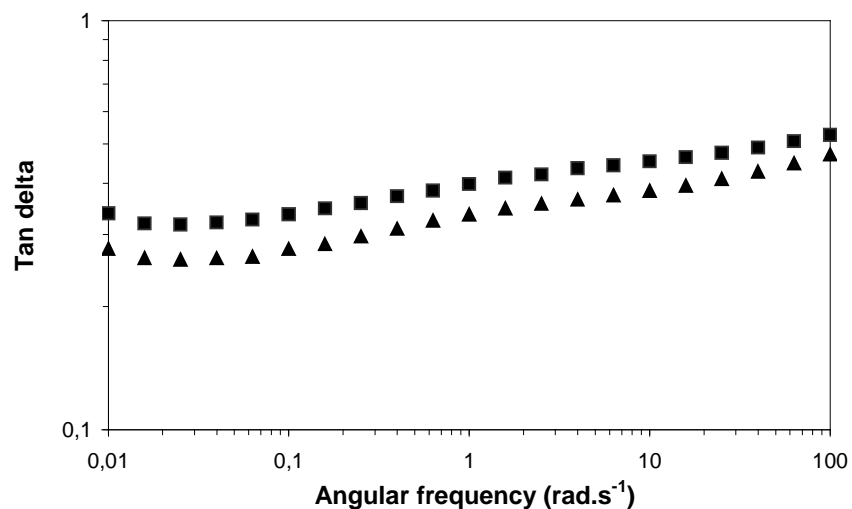


Fig. 3B.2. Tangents of the loss angles (G''/G') plotted as a function of the angular frequency, at 25°C, for the gluten samples (\blacksquare) Orvantis 6 and (\blacktriangle) Isengrain 1. See Table 3B.1.

This indicates a higher capacity - in relative terms - to store mechanical energy. Thus, gluten I6 appeared more "elastic" than gluten O1, suggesting indeed that gluten "elasticity" increased with the proportion of SDS-insoluble glutenin. However, effective investigation of the relationships between gluten linear viscoelasticity and its content in SDS-insoluble glutenin requires rheologically relevant and physically meaningful parameters to be extracted from the mechanical spectra. This is the object of the Cole-Cole analysis of the spectra.

III.4. Relationship between gluten elasticity and content in SDS-insoluble glutenin

Mechanical spectra of gluten samples were submitted to analysis described in part II.6. Some examples of fitting Cole-Cole arc to experimental data are showed in Fig. 3B.3a-b. As illustrated by the latter figure, the Cole-Cole circle fitted only the data corresponding to the highest frequencies within the experimental window, corresponding to the smallest values of J' and J'' . This is because the contribution of slow loss mechanisms, which increases as frequency decreases, becomes then non-negligible. Slow loss mechanisms are responsible for the loss compliance peak, which marks the limit of the viscoelastic plateau in the direction of low frequencies. This "slow" loss compliance peak of gluten, which can be framed in retardation tests (Lefebvre et al., 2003), is not visible usually within the experimental frequency window of dynamic measurements. However, in this window, its "down-slope" overlaps the "up-slope" of the high frequency loss peak, which marks the high frequency limit of the plateau and which is the one used in our analysis (Lefebvre et al., 1993, 2000, 2003).

Despite the fact that only a limited number of experimental data can be used to fit the Cole-Cole circle, reasonable confidence can be placed in the results of the fit, since it involved only two adjustable parameters, the plateau compliance J_N° and the spread parameter n . The coefficients of variation were 7% and 2% on G_N° and on n , respectively (two repetitions), involving sample preparation reproducibility - probably the main source of variation-, rheometrical error and Cole-Cole fit incertitude. The incertitude was much higher (CV = 35%) on ω_b , as already reported by Lefebvre et al. (2000). This should be kept in mind when comparing the results obtained on the different gluten samples.

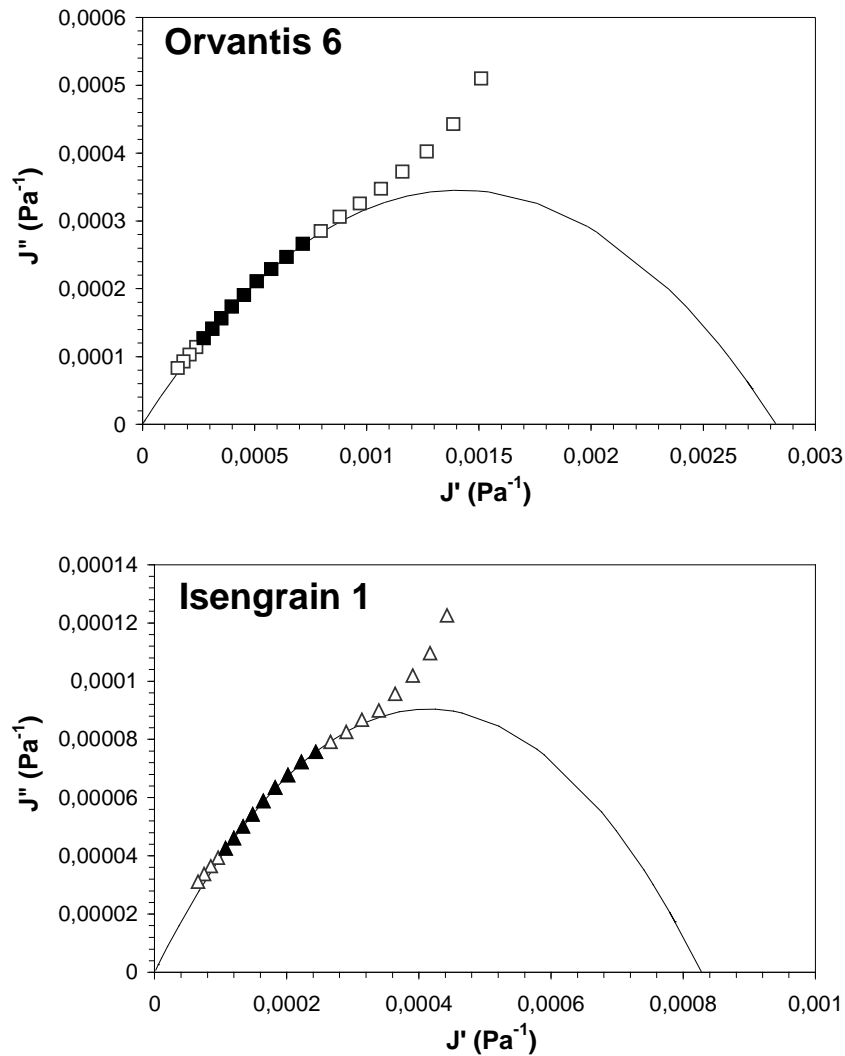


Fig. 3B.3. Data from Fig. 3B.1 plotted in the complex compliance plane ($J'(\omega)$ vs $J''(\omega)$). Solid lines show the Cole-Cole arcs of circle obtained by fitting Eq. (3) to experimental data in the high frequency region of the spectra. Open symbols are for the experimental data and closed symbols are for the Cole-Cole fitting data.

The Cole-Cole parameters G_N° , n and ω_b obtained for all the gluten samples are given in Table 3B.3. The plateau modulus G_N° varied by a factor of 3.6, from 350 Pa (O1) to 1270 Pa (I3), while the spread parameter n was nearly the same for all the samples, around the mean value of 0.29. The n value was just very slightly higher for Orvantis gluten samples (mean value of 0.31) than for Caphorn (mean value of 0.29) or Isengrain (mean value of 0.28) ones. As already stressed, the incertitude on ω_b was rather high, so that one should consider that this parameter did not show large differences from one gluten to another ($\omega_b \sim 0.03$ rad/s). For these reasons, we shall focus the discussion on G_N° .

Table 3B.3. Cole-Cole parameters obtained for the gluten samples

Wheat cultivar		G_N° (Pa)	ω_0 (rad.s ⁻¹)	n
Orvantis	O1	354	0.014	0.305
	O2	642	0.015	0.303
	O3	639	0.021	0.309
	O4	784	0.034	0.309
	O5	853	0.022	0.303
	O6	751	0.018	0.307
Caphorn	C1	535	0.027	0.296
	C2	660	0.003	0.272
	C3	727	0.011	0.284
	C4	944	0.007	0.264
	C5	1 059	0.025	0.281
	C6	1 000	0.052	0.291
	C7	949	0.120	0.320
Isengrain	I1	707	0.023	0.284
	I2	1 166	0.023	0.279
	I3	1 268	0.036	0.278
	I4	1 227	0.111	0.307
	I5	1 261	0.038	0.280
	I6	1 208	0.019	0.274

In Fig. 3B.4a, the plateau modulus G_N° is plotted against the SDS-insoluble glutenin content for all the gluten samples. A positive linear relation fitted the experimental data with a good accuracy ($R^2 = 0.74$). Since all the gluten samples tested had the same protein content (Table 3B.1) and varied only through their content in SDS-insoluble glutenin content (Table 3B.2), Fig. 3B.4a demonstrates that increasing specifically the content in SDS-insoluble glutenin considerably increases gluten network elasticity. Nevertheless, the regression line did not pass through the origin and intersected the vertical axis at $G_N^\circ \sim 300$ Pa. Thus, the formation of a gluten network does not seem to require the presence of the proteins constituting the SDS-insoluble glutenin fraction.

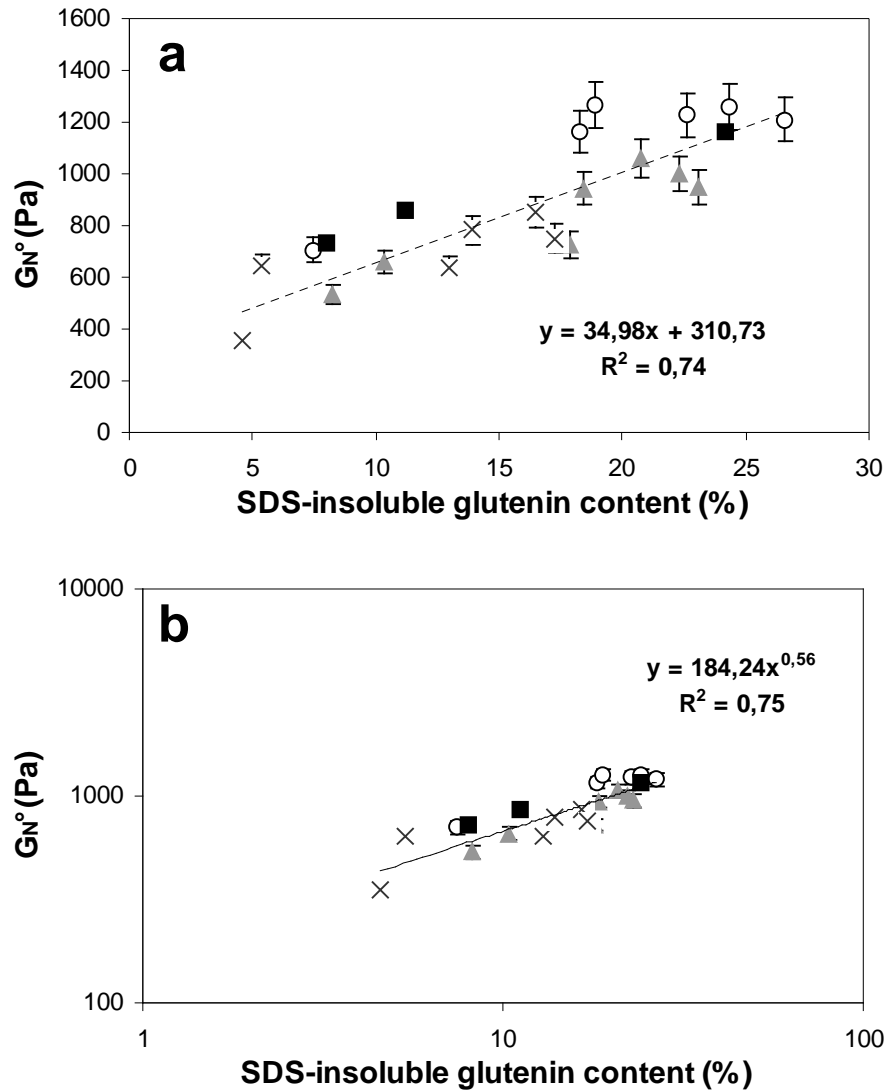


Fig. 3B.4. Variation of the plateau modulus G_N^0 with the SDS-insoluble glutenin content of the glutes. (a) Linear plot. (b) Log-log plot. Crosses: gluten samples from Orvantis; Triangles: gluten samples from Caphorn; Circles: gluten samples from Isengrain. Errors bars correspond to the coefficients of variation. Closed squares: commercial gluten samples tested. Dotted line: linear fit of the experimental data from Orvantis, Caphorn and Isengrain.

In the literature, Cornec et al. (1994) and Popineau et al. (1994) found a power law relationship between G_N^0 and the proportion of higher size glutenin polymers in gluten subfractions. As showed in Fig. 3B.4b, a power law fitted as well our experimental data ($R^2 = 0.75$). Nevertheless, our results did not match quantitatively those of the cited authors. In particular, the dependence of G_N^0 on the gluten content in SDS-insoluble glutenin was, in our case, very much less steep, as we found a power exponent of only 0.56, whereas cited authors found power exponents superior to 3. However, quantitative comparisons are not possible for two reasons. First, the acid extraction used by the cited authors could have affected the rheological properties of gluten subfractions. Second, the cited authors worked on gluten

fractions presenting variable glutenin to gliadin ratios and, as reported by Khatkar et al. (1995) and Janssen et al. (1996), this would have affected gluten elasticity and could have increased the amplitude of G_N° values. Indeed, the range of SDS-insoluble glutenin content covered in the present study was not as large as performed in the literature (Cornec et al., 1994; Popineau et al., 1994; Lefebvre et al., 2000; Domenek et al., 2004). However, as we isolated the gluten samples from a gentle batter process that did not induce detergents, pressure or high temperature, it would not have been possible to widen the studied range.

The structural and physical meaning of such a low value of the power exponent (0.56) is still not understood. As far as we searched in the literature dealing on the rheology of polymers and sphere suspensions, we did not find other physical system presenting such a low value. However, the results obtained were ascertained by the fair reproducibility of the G_N° values (CV = 7%) and by the strong correlation between G_N° and the amount of SDS-insoluble glutenin in gluten (Fig. 3B.4a-b). To check this correlation, we have submitted three commercial gluten samples (part II.1), which contained 81% of proteins after purification, to the same purification procedure and rheological characterization as the other gluten samples. Their plateau modulus values fell close to the regression lines obtained in Fig. 3B.4a-b when plotted against their contents in SDS-insoluble glutenin. Further experiments, such as calculations of gluten volume fraction (Domenek et al., 2004), would be necessary to understand the real meaning of the power exponent obtained.

IV. Conclusion

In the present work, the rheological behaviour of standardized and common wheat gluten samples was tested. These gluten samples contained variable proportions in SDS-insoluble glutenins, while keeping the same proportion in total glutenin, gliadin and soluble protein, and the same glutenin to gliadin ratio of ca. 1.3. The elasticity of such gluten samples was strongly correlated with their content in large glutenin polymers: a higher content in SDS-insoluble glutenin induced a greater elasticity of gluten. However, the range of G_N° values obtained for such standardized gluten samples was quite narrow, in comparison of the values found in the literature. For the gluten samples tested, G_N° varied from 300 to 1300 Pa. Further studies would remain to be performed to better understand why such apparently large differences occurred between the standardized gluten samples tested in the present work and those tested in the literature, obtained with other procedure of gluten extraction and gluten preparation.

RESUME/CONCLUSION

Cette étude confirme que l'élasticité du gluten augmente bien spécifiquement avec sa teneur en polymères de gluténine insolubles dans le SDS (fraction Fi). Un gluten pauvre en Fi est par conséquent très peu élastique, tandis qu'un gluten riche en Fi est très élastique.

Cette étude complète également les résultats et hypothèses présentés dans le **Chapitre 3A**. On peut ainsi conclure que l'historique du pétrissage n'affecte absolument pas le rendement d'extraction du gluten à t_{peak} , qui reste stable autour de 82%. Par contre, plus le temps de mélange ($N.t_{peak}$) nécessaire au développement optimal de la pâte augmente, plus la capacité repolymérisante en fraction Fi des glutens diminue. Les filaments de gluten, alors pauvres en Fi , ne présentent plus suffisamment d'élasticité pour retenir les grains d'amidon qui s'échappent du réseau de gluten lors du lavage de la pâte. Le gluten extrait est alors très pur en protéines.

CHAPITRE 4

EXTRACTION ET QUALITE DU GLUTEN EXTRAIT EN SOUS- ET SUR-PETRISSAGE

Chapitre 4A – Influence du pétrissage sur le rendement d'extraction et la composition du gluten tout au long du pétrissage

OBJECTIF

Dans le **Chapitre 3A**, nous nous sommes intéressés à l'extraction du gluten uniquement à l'optimum de développement de la pâte. Pour cela, différentes conditions de pétrissage ont été utilisées, ce qui nous a permis de mettre en évidence que l'historique du pétrissage, qui n'influence pas le rendement d'extraction du gluten à t_{peak} , influence par ailleurs énormément la composition biochimique du gluten (**Chapitre 3A**) et sa qualité rhéologique (**Chapitre 3B**).

Au cours du **Chapitre 3A**, nous avons observé qu'à l'optimum de développement de la pâte, le rendement d'extraction du gluten était toujours constant ($\approx 82\%$) et que la teneur de la pâte en polymères de gluténine insolubles dans le SDS était elle aussi constante et quasiment nulle ($\approx 4\%$). Au cours du présent chapitre, nous proposons d'élargir l'étude précédente à la totalité du pétrissage, à savoir au sous- et sur-pétrissage. Cette étude a pour objectif de suivre les cinétiques d'agglomération des protéines du gluten ainsi que les cinétiques de dépolymérisation des polymères de gluténine insolubles dans le SDS au cours du pétrissage complet de la pâte. Ceci devrait permettre de valider ou de réfuter les hypothèses que nous avons émises dans le **Chapitre 3A**, à savoir que le rendement d'extraction du gluten serait maximal à t_{peak} , tandis que la teneur de la pâte en polymères de gluténine insolubles dans le SDS y serait minimale.

De plus, dans le **Chapitre 3A**, nous avons proposé un schéma réactionnel inédit qui présente les voies de dépolymérisation et de repolymérisation des polymères de gluténine insolubles dans le SDS. Nous proposons dans le présent chapitre de vérifier que ce modèle s'applique tout au long du pétrissage, à la fois en sous- et sur-pétrissage.

Publication n°5 - Influence of mixing on gluten protein recovery and composition. II. Extraction from under- and over-mixed batters*

Abstract

The present study extends our previous work dealing on gluten extraction from optimally developed batters (**Chapter 3A**). Here, gluten and starch were extracted from under-, optimally- and over-mixed batters using a flour batter process, which included three successive steps: mixing, washing and sieving. In order to reveal the specific influence of the mixing step, a standardized gentle washing and sieving procedure was selected. Two sets of batters were studied for the three wheat cultivars Orvantis, Caphorn and Isengrain: a set of fast batters, for which optimal dough development occurred after ca. 20-40 min of mixing, and a set of slow batters, for which optimal dough development occurred after ca. 100 min. Mixing promoted the agglomeration of gluten proteins, which were recovered as agglomerates during under-mixing. We showed that evolution of gluten protein recovery and purity followed the degree of dough development. For all the batters, the gluten protein recovery progressively increased during the lag phase and was maximal at the optimal dough development, where a protein recovery of ca. 82% was obtained. Then, gluten protein recovery decreased during over-mixing. In contrast, the protein content of the extracted gluten decreased during under-mixing, was minimal at the optimal dough development and increased during over-mixing. We showed that dough development relied on the breakdown of flour SDS-insoluble glutenin polymers. In consistent batters, this breakdown was mainly mechanically driven, whereas it was mainly chemically or enzymatically driven in the case of more dilute batters. Mixing experiments with NEMI provided evidence that a spontaneous reaction, which allowed the reformation of SDS-insoluble glutenin, occurred during mixing and counteracted the glutenin breakdown. This reaction considerably slowed down the optimal development of the batter.

*Auger, F., Morel, M.H., Dewilde, M., Redl, A., 2008. *In preparation.*

I. Introduction

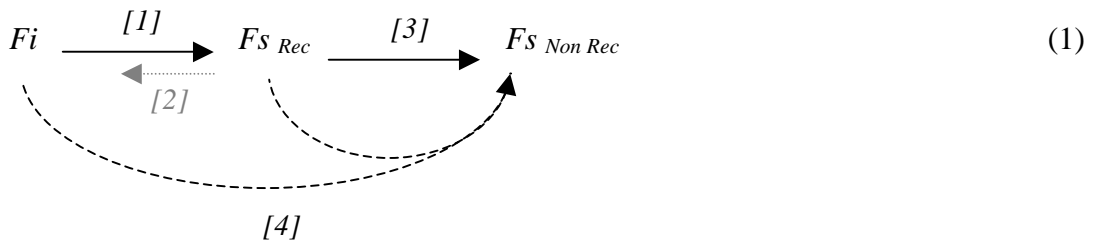
Separation of wheat flour into vital gluten and starch is a very ancient practice, which has been continuously modified all along the last century (Anderson et al., 1958; Robertson and Cao, 1998). Nowadays, vital gluten is mainly extracted industrially by the batter process and all its derivatives (Roels et al., 1998). This process involves three successive steps: mixing, washing and separation. At first, flour is mixed with water using water/flour ratios between 0.7 to 1.8 (Anderson et al., 1958) to give a batter. Different mixing technologies can be used to promote or not gluten network development during the mixing step (**Chapters 1 and 3A**). The batter is then broken up mechanically during the washing step by mixing it in presence of large amounts of additional water to produce gluten lumps, suspended in the starch suspension (Anderson et al., 1958). Finally, the gluten/starch separation is performed using gyrating or vibrating sieves, centrifuges, decanters or hydrocyclones (Anderson et al., 1958, 1960; Fellers, 1973; Meuser et al., 1989; Sindic et al., 1993).

We recently gave evidence and explained how the first mixing step of the batter process influences the gluten protein recovery and composition from an optimally developed batter (**Chapter 3A**). For that, we extracted gluten samples from batters mixed at optimal dough development. We used a standardized and gentle washing and separation procedure, to maintain as constant as possible the gluten protein interactions built-up during the first mixing step. We found a high and stable protein recovery of ca. 82%, whatever the mixing conditions used (batter water content or mixing speed). In agreement with Frederix et al. (2004), we suggested that mixing influenced the gluten/starch separation efficiency through the degree of dough development it promoted. Nevertheless, gluten samples were extracted only from optimally mixed batters and the assumption needed to be ascertained from studies carried out with under- and over-mixed batters. This is the first objective of the present work.

The amount and quality of the flour glutenin polymers, especially the largest ones insoluble in Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), is already known to play an important role in the dough rheological properties and in the quality of flour for breadmaking (Graveland, 1984, Moonen et al., 1986; Weegels et al., 1996; Sapirstein and Suchy, 1999; Peighambardoust et al., 2006a). During bread dough mixing, the molecular size distribution of glutenin polymers is shifted toward the smaller species, as shown by the breakdown of SDS-insoluble glutenin (Graveland, 1984; Weegels et al., 1995; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001; Don et al., 2003). This event is known to occur in a more or less reversible way in bread dough, depending on the extent of mixing (Weegels et al., 1997; Aussenac et al., 2001; Don et al.,

2005b). In **Chapter 3A**, we found that mixing a batter to the optimal development also led to the total breakdown of the flour SDS-insoluble glutenin. However, a subsequent gluten extraction led to a variable reformation of SDS-insoluble glutenin, depending on the mixing condition used. In the same work, we showed that extracted gluten displaying the highest content in SDS-insoluble glutenin also displayed the lowest protein content. All these preliminary results suggested the importance of SDS-insoluble glutenin in batter mixing, gluten formation and gluten quality.

In **Chapter 3A**, we have proposed a general mechanism accounting for the breakdown and the re-assembly of SDS-insoluble glutenin that could occur during batter mixing and subsequent gluten extraction. This mechanism is presented as follows:



where Fi is the flour SDS-insoluble glutenin polymer fraction, $F_{S \text{ Rec}}$ is a recoverable SDS-soluble glutenin polymer fraction and $F_{S \text{ Non Rec}}$ is for a SDS-soluble glutenin fraction that can not be recovered as a SDS-insoluble fraction.

This mechanism was proposed for optimally mixed batters. In that respect:

- Reaction [1] allows the breakdown of large Fi to form $F_{S \text{ Rec}}$. This reaction is favoured when the mixing efficiency, *i.e.* the mixing stress, increases.
- Reaction [2] allows the re-assembly of Fi fractions from $F_{S \text{ Rec}}$. This reaction is known to occur spontaneously when the mixing stops (Weegels et al., 1997, Don et al., 2005b).
- Reaction [3] allows the formation of $F_{S \text{ Non Rec}}$ from $F_{S \text{ Rec}}$. Its extent is related to the number of mixing revolutions. We hypothesized that the irreversible oxidation of thiol groups involved in the glutenin inter-chains bonding is at the origin of the accumulation of $F_{S \text{ Non Rec}}$.
- Reaction [4] allows the rapid formation of $F_{S \text{ Non Rec}}$ either from Fi or $F_{S \text{ Rec}}$. This reaction is specific of some wheat cultivars. We showed that reaction [4] exists for the cultivar Orvantis but not for the cultivars Caphorn and Isengrain. This reaction might be chemically or enzymatically driven and favoured by the presence of a specific flour constituent.

Ascertaining the availability of this general mechanism in under- and over-mixing conditions is the second objective of the present work. In consequence, we propose to follow the evolution of the protein recovery and composition of gluten extracted from under- and over-mixed batters to gain more insight into how the degree of dough development really influences the efficiency of the gluten/starch separation. For that, the washing and separation procedures will be kept very gentle. The effect of mixing on the changes in the molecular size distribution of glutenin will be also presented in batters and extracted gluten samples to validate the general mechanism presented above (Scheme 1).

II. Experimental

II.1. Flours

Same commercial wheat grain samples - cvs. Orvantis, Caphorn and Isengrain (France, harvest 2004)- as used in previous studies (**Chapters 2A and 3A**) were milled again on a Bühler laboratory mill (MLU 202, Bühler, Switzerland) according to AACC (2000) method 26-31. Moisture and ash contents were determined according to AACC methods (44-15A, 08-01, respectively). The protein content ($N \times 5.7$) was determined using Kjeldahl method. Soluble (WEAX) and total arabinoxylan contents were determined as described by Rouau and Surget (1994). Biochemical characteristics of the flours are given in Table 4A.1.

Table 4A.1. Flour characteristics

Wheat cultivar	Extraction rate (%)	Dry matter (%)	Ash (% db)	Protein (% db)	WEAX (% db)	Total AX (% db)
Orvantis	71.08	85.48	0.41	10.75	0.58	2.33
Caphorn	71.69	85.98	0.46	10.32	0.62	2.16
Isengrain	72.92	86.47	0.44	10.09	0.35	1.80

II.2. Gluten isolation

Gluten samples were extracted from under-, optimally- and over-mixed batters using a simplified laboratory batter process described in **Chapter 3A**. The process included the three successive conventional operations: mixing, washing and separation.

II.2.1. Mixing step

Flour-water blends were mixed at 25°C using a planetary mixer bowl P600 (Brabender OHG, Germany), as described in **Chapter 2A**. Total dough mass was 550 g and all ingredients were equilibrated at 25°C before mixing. In this work, two mixing conditions were tested for each cultivar in order to obtain a fast dough development, with a time for optimal development (t_{peak}) of ca. 20-40 min, and a slow dough development, with a t_{peak} of ca. 100 min. From our previous work (**Chapter 3A**), contrasted gluten purities and contents in SDS-insoluble glutenin should be expected from fast and slow batters, once optimally developed. To obtain fast and slow batters, we chose to use, for each cultivar, two levels of flour/water (F/W) ratio as different as possible but still in the range of the F/W ratios used in our previous works (**Chapters 2A and 3A**). The mixing speeds were then selected in the range of 80-100 rpm in order to get the considered t_{peak} values. Mixing conditions selected to obtain the fast batters were: 1.08 F/W at 80 rpm for Orvantis, 1.25 F/W at 100 rpm for Caphorn, and 1.39 F/W at 100 rpm for Isengrain. The corresponding t_{peak} values were exactly 42 min, 21 min and 43 min for the fast batters of Orvantis, Caphorn and Isengrain, respectively. Mixing conditions selected to obtain the slow batters were: 1.04 F/W at 90 rpm for Orvantis, 1.18 F/W at 85 rpm for Caphorn, and 1.34 F/W at 90 rpm for Isengrain. The corresponding t_{peak} values were exactly 106 min, 105 min and 96 min for the slow batters of Orvantis, Caphorn and Isengrain, respectively. For all the batters, mixing was stopped at different degrees of batter development (0.1-0.3-0.5-0.7-0.9-1.0-1.2 t_{peak}) to extract the gluten in under- (< 1), optimally- (= 1) and over-mixing (> 1) conditions. To follow glutenin breakdown during mixing, portions of batters (2 g) sampled during mixing were frozen immediately in liquid nitrogen, freeze-dried and ground into powder before analysis.

II.2.2. Washing step

The mixed batters were immediately diluted with additional water (1000 mL) and stirred gently for 10 min at 25°C, as indicated previously in **Chapter 3A**.

II.2.3. Separation step

The gluten-starch suspension obtained after the washing step was sieved as previously described (**Chapter 3A**). Gluten samples, recovered separately on the three sieves, were rested during 30 min at ambient temperature before being frozen in a freezer at -20°C, lyophilised and ground into powder. From the end of mixing and the deposit of glutes into the freezer, the global time for washing, sieving and resting was exactly the same for all the experiments (ca. 60 min).

II.3. Flour, dough and gluten protein size distribution by SE-HPLC

Extraction and SE-HPLC analysis of protein from flours, powdered freeze-dried batters and gluten samples was carried out as previously described by Morel et al. (2000) by performing two sequential extractions. The first with a 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing 1% SDS, and the second with the same buffer and a sonication step to disperse SDS-insoluble glutenin polymers. Supernatants obtained from these extractions were injected onto a size exclusion column TSK-G 4000-SW (Merck, France) (7.5 mm x 30 cm) equipped with a TSK 3000-SW (Merck, France) guard column (7.5 mm, 7.5 cm). SDS-insoluble glutenin (Fi) content was obtained from the total area of the chromatogram of the second extract. The elution profile of the first extract was divided into five fractions ($F1$ to $F5$, from the first to the latter eluting fractions). All the areas under the chromatogram were expressed in % of the total protein, estimated from the sum of the total areas under the chromatograms of the two extracts, once corrected for their different solid-to-solvent ratios (Morel and Bar-L'Helgouac'h, 2000). Glutenin content was estimated from the sum of fractions Fi , $F1$ and $F2$, gliadin content from the sum of fractions $F3$ and $F4$ and albumin/globulin content from the fraction $F5$.

II.4. Protein content of gluten samples

The protein content of gluten samples (GPC) was determined using Kjeldahl method ($N \times 5.7$). The coefficient of variation of the analysis was less than 1%. Recoveries in gluten of total protein (GPR), glutenin (Glu Rec), gliadin (Gli Rec) and albumin/globulin (Alb/Glo Rec) were calculated in mass percent of their equivalent counterpart in flour (db), as described in **Chapter 3A**. An indexed form of the above abbreviations was used when the gluten recovered from a specific sieve was only considered (*i.e.* GPR₈₀₀ for the gluten protein recovery obtained on the 800 μ m sieve).

As already introduced previously (**Chapter 3A**), the recovery of SDS-insoluble glutenin reformed into the gluten was calculated as follows:

$$Gluten\ FiRec = \frac{\left(\frac{mFi_{gluten} \times 100}{Glu\ Rec} \right)}{mFi_{flour}} \times 100 \quad (2)$$

where mFi_{gluten} is the mass (g) of Fi fraction included in gluten, Glu Rec is the glutenin recovery (%) and mFi_{flour} is the mass (g) of Fi fraction included in the flour mass of the batter.

II.5. Batter mixing with *N*-ethylmaleimide

For the three cultivars, mixing conditions leading to batter development in about 100 min (slow batters, see part II.2.1) were also carried out in the presence of a thiol-blocking agent, *N*-ethylmaleimide (Sigma, Germany), to avoid all possible mechanisms of glutenin re-assembly. The *N*-ethylmaleimide (NEMI) was directly added in the mixing water at a dose of 10 μ moles of NEMI/g of flour protein. Batters were mixed until their optimal dough development. A portion (2 g) of batter was immediately sampled at t_{peak} while the gluten was extracted and analyzed as above.

III. Results

III.1. Batter mixing curves and dough samplings

Batter mixing curves and dough sampling times are presented in Fig. 4A.1. As introduced previously (**Chapter 2A**), a typical batter mixing curve is characterized by a first decrease of torque (referred to as decay phase), a lag phase where the torque is generally minimal and remains fairly constant for variable lapses of time, a sudden and progressive torque rise to the optimal dough development that occurs at t_{peak} . Following the optimum peak, the torque collapses more or less upon further mixing, depending on the flour and the mixing condition used (Fig. 4A.1). A batter sampled before t_{peak} is defined as being under-mixed, while a batter sampled after t_{peak} is defined as being over-mixed.

We previously showed (**Chapter 2A**) that during the first decay phase, the initial small protein particles ($> 20 \mu\text{m}$), which were evenly dispersed within the batter, merged into some growing agglomerates, referred to as gluten lumps ($> 100\text{-}200 \mu\text{m}$). Decrease in torque seemed to be due to the condensation of a lot of small interacting particles into discrete and large protein agglomerates. During the lag phase, the mean size of gluten lumps could slightly increase but the main striking feature was the apparition of gluten strands (**Chapter 2A**). The final torque rise coincided with the massive transition from gluten lumps to gluten strands and to the formation of the filamentous gluten network at t_{peak} .

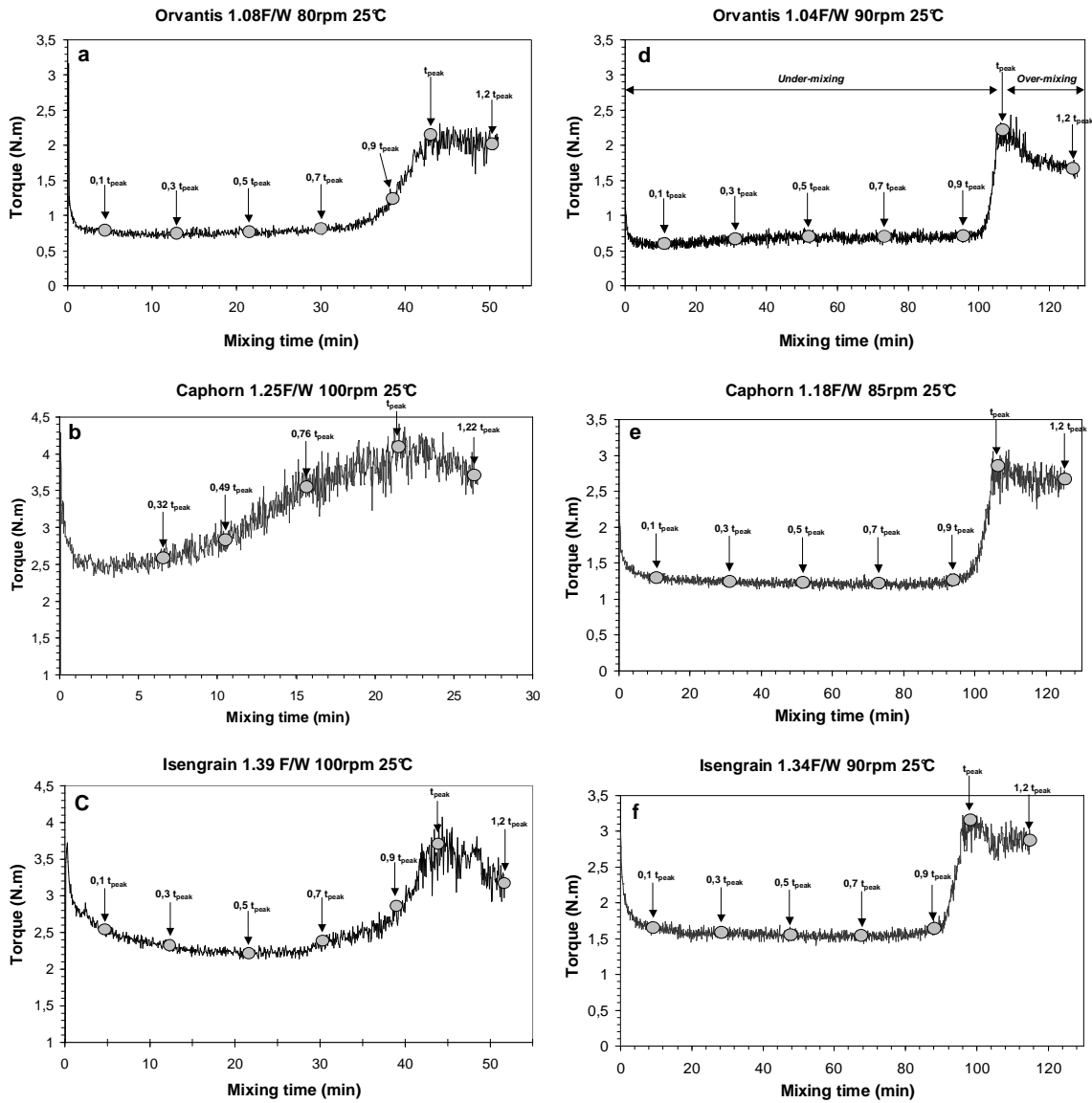


Fig. 4A.1. Batter mixing curves and samplings performed for the cultivars Orvantis, Caphorn and Isengrain. (a-c) Fast batters on the left and (d-f) slow batters on the right. t_{peak} is the time for optimal dough development.

Differences in batter mixing curves can be observed in Fig. 4A.1, according to the duration of each of the mixing phases and torque values. For each cultivar, mixing was performed several times in order to extract gluten from a batter obtained at different degrees of development. Sampling times (t_s) were standardized with respect to the t_{peak} value. The mixer was stopped at 0.1-0.3-0.5-0.7-0.9-1.0-1.2 t_{peak} to give under-, optimally- ($t_s/t_{peak} = 1$) and over-mixed batters. Importantly, the degree of dough development reached after a given sampling was not necessarily similar for all the batters tested (Fig. 4A.1). For example, the end of the lag phase and the beginning of the torque rise occurred after 0.7 t_{peak} for the fast Isengrain batter (Fig. 4A.1c) while it occurred after 0.9 t_{peak} for the slow one (Fig. 4A.1f).

III.2. Influence of mixing on the SDS-insoluble glutenin content of batters

Evolution of the batter SDS-insoluble glutenin (F_i) content during mixing is depicted in Fig. 4A.2a. For the three cultivars, the initial time ($t_s = 0$) referred to the parental flour sample. Flours showed variable F_i contents of 15.5%, 21.5%, and 20.9% for the cultivars Orvantis, Caphorn and Isengrain, respectively.

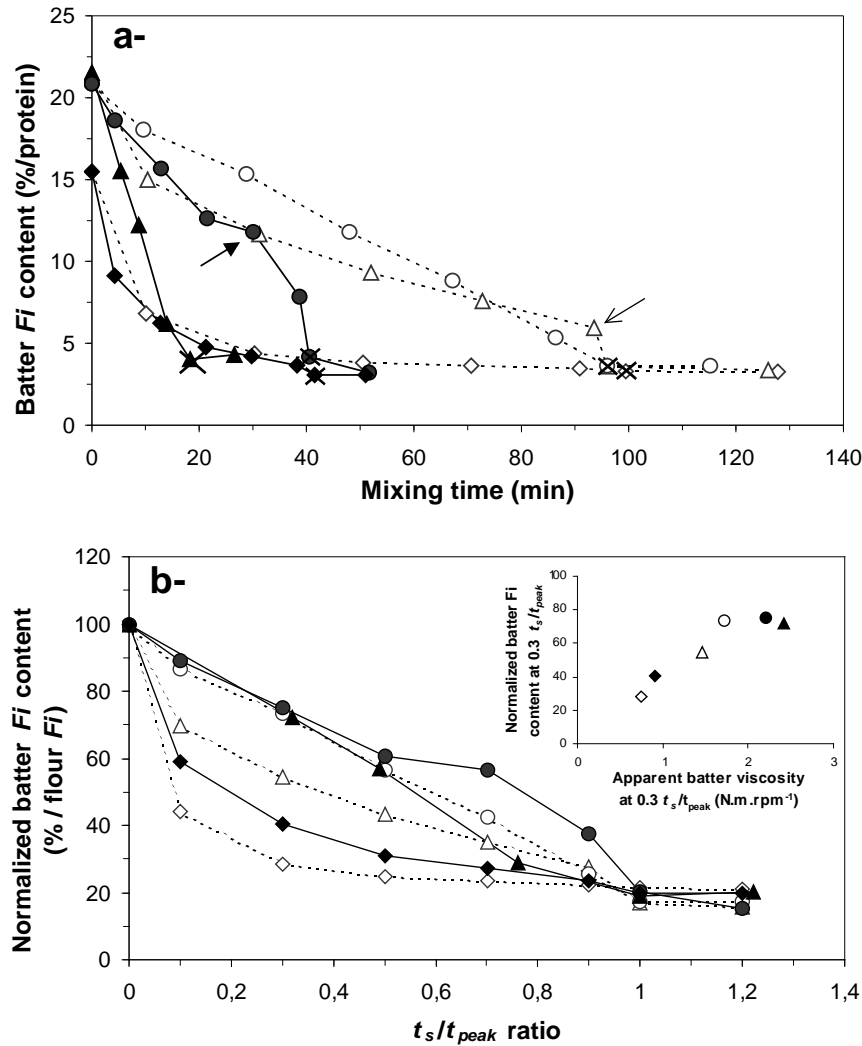


Fig. 4A.2. (a) Evolution of the SDS-insoluble glutenin (F_i) content of batter in function of mixing time. (b) Evolution of the normalized batter F_i content (% of flour F_i) during mixing. t_s is the sampling time reported in Fig. 4A.1 and t_{peak} is the time for optimal dough development. Results from batters (◆,◇) Orvantis, (▲,△) Caphorn, and (●,○) Isengrain. For each cultivar, closed symbols are for the fast batters and open symbols are for the slow ones, see Fig. 4A.1. In Fig. 4A.2a, crossed symbols are for the batters sampled at t_{peak} and arrows showed the beginning of torque rise for some mixing conditions. Insert in Fig. 4A.2b plots the normalized batter F_i content obtained at $0.3 t_s/t_{peak}$ versus the apparent batter viscosity (estimated as mixing torque*100 / mixing speed) at $0.3 t_s/t_{peak}$.

The SDS-insoluble glutenin polymers, initially present in the flour, were broken down during mixing, as reported elsewhere on bread doughs (Weegels et al., 1995; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001; Don et al., 2003; Aït-Kaddour et al., 2007). The decrease of SDS-insoluble glutenin was balanced by the formation of SDS-soluble glutenin (*F1* and *F2*) (*not shown*).

For all the experiments, the batter *Fi* content was minimal at t_{peak} (ca. 3-4 %, crossed symbols in Fig. 4A.2a) and remained stable during over-mixing. Therefore, getting the optimal batter development induced the almost total breakdown of SDS-insoluble glutenin. The kinetic of *Fi* breakdown considerably differed according to the wheat cultivar and the mixing condition used (Fig. 4A.2a). While it appeared as a monotonic and a continuous event over the entire mixing for the major part of batters studied, the *Fi* breakdown also showed, sometimes, a fast and prompt acceleration occurring at the end of the mixing, as the torque began to rise to peak development. This is particularly clear in the case of the slow batters of Caphorn (Fig. 4A.2a, open arrow) and Isengrain (Fig. 4A.2a, plain arrow). Nevertheless, *Fi* attained its minimal value exactly at t_{peak} for all the mixed batters and whatever the kinetic observed (Fig. 4A.2a). The torque rise preceding t_{peak} signaled the massive occurrence of gluten strands and the formation of a connected filamentous gluten network (**Chapter 2A**). Thus, gluten would have suffered larger deformations and higher mixing stresses during the torque rise than during the lag phase, during which gluten was in the form of discrete lumps conveyed by a suspending sheared fluid. This could explain why the *Fi* breakdown was accelerated during torque rise.

For the slow Orvantis batter, a large part of the amount of flour *Fi* fraction was broken down very rapidly. After only 30 min of mixing, the *Fi* content of this batter was 4.4%. However, dough development occurred only 76 min later, as the batter *Fi* content reached its floor value of 3.3%. Thus, almost 75% of the total mixing time has been occupied to breakdown only 1.1% of SDS-insoluble glutenin. Even if such a low amount seems insignificant, it is tempting to conclude that the breakdown of the entire pool of the flour SDS-insoluble glutenin, until the last polymer, is required for the filamentous gluten network formation of this batter. For the other slow batters of Caphorn and Isengrain, the *Fi* breakdown was monotonic or even linear (slow Isengrain batter in Fig. 4A.2a) all along the mixing to peak development. In these latter cases, gluten network development seemed to be the natural conclusion of *Fi* exhaustion. So, depending on the mixing condition used, the *Fi* breakdown appeared as a cause but also as a consequence of the optimal batter development. As a cause for the very dilute batters (slow batters), for which the torque rise only started

when the batter Fi content was almost broken down (Fig. 4A.2a). As a consequence for the more consistent fast batters (Fig. 4A.1), for which the torque rise started for high values of batter Fi content and then induced the total breakdown of batter Fi fractions. Moreover, we can observe in Figs. 4A.2a and 4A.1 that the torque rise started for higher values of batter Fi content as the baseline consistency of the batter (Γ_b) increased, by increasing the F/W ratio. Indeed, the torque rise started for batter Fi contents of 6%, 12% and 15% for the slow Caphorn batter, the fast Isengrain batter and the fast Caphorn batter, which respectively showed a Γ_b value of 1.1, 2.2 and 2.5 N.m.

The use of a reduced time scale (t_s/t_{peak}) coupled to a normalization of the amount of batter Fi fraction to that of the parental flour did not allow to fit all the kinetics of Fi breakdown onto a single master curve (Fig. 4A.2b). This feature, which could be rather anticipated from the scatter of the plots given in Fig. 4A.2a, indicates that the mechanism of Fi breakdown varied from a mixing condition to another. Nevertheless, kinetics of Fi breakdown observed for the two Isengrain batters and the fast Caphorn batter were superimposed from 0 to $0.5 t_{peak}$ (Fig. 4A.2b). Above this value, kinetics of the fast batters of Caphorn and Isengrain diverged from linearity. From the Fig. 4A.1b-c, it is clear that $0.5 t_{peak}$ marked the end of the lag phase for these batters. In consequence, deviation of the Fi breakdown from a monotonic course was not unforeseen. The deviation from a linear behaviour seemed to originate rather from the mixing conditions than from the flour type. It was striking to observe that Caphorn showed both a linear and a curvilinear kinetic of Fi breakdown, according to the mixing condition used (Fig. 4A.2a). The plots inserted in Fig. 4A.2b support the hypothesis that the shift from one behaviour to another could be related to the apparent viscosity of the batter during the lag phase, estimated by the ratio between the baseline torque and the mixing speed Γ_b/N (**Chapter 2A**). A low apparent viscosity, which results from a large amount of free water not absorbed by the flour constituents, seemed to favour a non-linear kinetic of Fi breakdown (Fig. 4A.2b + insert).

III.3. Effect of NEMI during batter mixing

In a preliminary work (**Chapter 3A**), we have previously proposed a reaction [2] in the Scheme (1), in order to account for the large recovery of SDS-insoluble glutenin polymers into the gluten samples extracted from optimally developed batters. Nevertheless, we did not discuss if the reaction [2], which obviously occurred during the gluten extraction process, could also exist during the batter mixing. However, the kinetics observed in Fig. 4A.2b

suggest that the breakdown of SDS-insoluble glutenin induced by the mixing stress (reaction [1]) may have been balanced by a reverse reaction, whose effectiveness varied according to the mixing condition used. If not, a unique master curve would have been found in Fig. 4A.2b, by taking into account the mixing stress applied on the batter, which is proportional to the mixing torque. However, the mechanism involved in glutenin breakdown is still under debate. Belton (2005) proposed that mixing favours the disruption of glutenin in SDS buffer without any change in the disulfide skeleton of the glutenin polymers. Nevertheless, the effect of thiol reducers and blockers on bread dough development time (Don, 2005a; Peressini et al., 2007) highlighted the importance of thiol/disulfide exchanges in gluten network formation.

In an attempt to block an eventual glutenin re-assembly through the reformation of glutenin inter-chains disulfide bonds, we added NEMI into the mixing water for the slow batters. Batter mixing curves obtained, with and without NEMI, are presented in Fig. 4A.3. For the three slow batters tested, adding NEMI considerably reduced the time for optimal dough development. No change in the mixing torque curve, which strictly overlaid the reference one before the onset of torque rise, was observed for the NEMI batters (Fig. 3). The new values of t_{peak} obtained with NEMI were 28.5 min for Orvantis, 17.5 min for Caphorn and 19.0 min for Isengrain, *i.e.* between 0.17-0.3 t_{peak} of the reference mixing times. The NEMI batters sampled at t_{peak} also showed the same floor Fi values as those reported above for the standard mixing conditions, and extracted gluten samples were very poor in SDS-insoluble glutenin, showing that NEMI prevented glutenin re-assembly (*not shown*). So, adding NEMI accelerated the kinetic of Fi breakdown and shortened batter development time, as already reported for bread dough (Don, 2005a). As no change in the applied mixing stress occurred, the feature signals the occurrence of an antagonist reaction that, in the absence of NEMI, considerably slowed-down the Fi breakdown.

A NEMI dose of 10 $\mu\text{moles/g}$ of protein was selected in this work because, according to the theoretical calculations introduced by Grosh and Wieser (1999), such an amount would be within the range of the number of thiol group involved in the glutenin inter-chain disulfide bonds. This dosage was 10 times lower than the dosage generally used to modify bread dough mixing time (Kaufman et al., 1986; Hosenev and Rogers, 1990; Don, 2005a; Peressini et al., 2007). Indeed, according to the experiments carried out by Don (2005a), a NEMI dose of 10 $\mu\text{moles/g}$ of flour (and not of protein) decreased bread dough mixing time by only 30%. For the three batters studied here, the time reduction was about 70-80% of the reference t_{peak} value (Fig. 4A.3). The different sensitivity of bread dough and batter toward NEMI addition could

be explained by differences in the balance between the reactions [1] and [2] of the Scheme (1). In bread dough, the reaction [1] would be so intensive due to the high consistency of the dough, resulting in a very high mixing stress, that the reaction [2] would not have time to be as prevalent as in the case of the more dilute batters studied here.

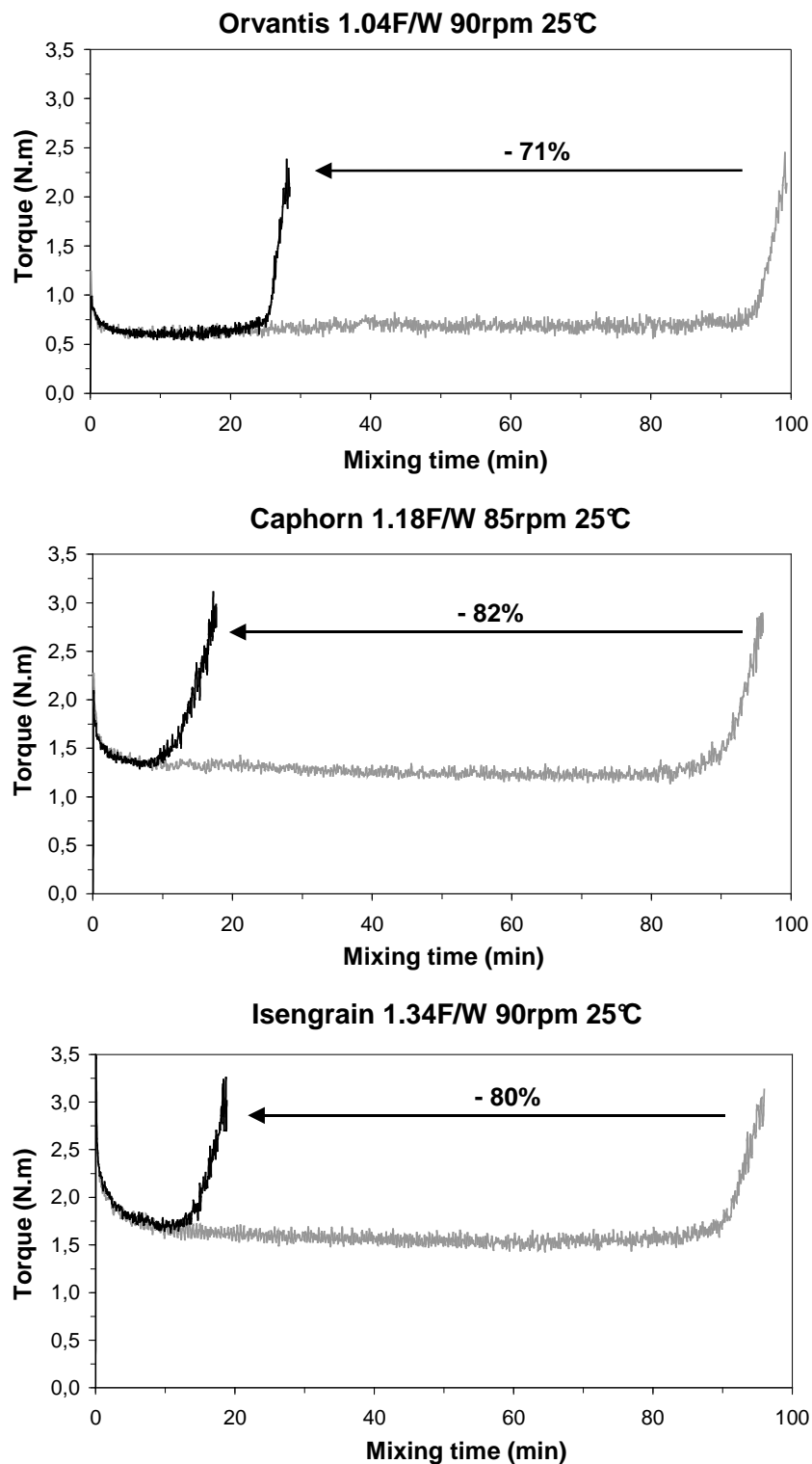


Fig. 4A.3. Batter mixing curves of slow batters Orvantis, Caphorn and Isengrain mixed (black line) with and (grey line) without *N*-ethylmaleimide at a dose of 10 μ moles/g of flour protein. See Fig. 4A.1 for mixing conditions.

As shown in Fig.4A.3, batters of Caphorn and Isengrain mixed with NEMI began to develop just after the end of the decay phase, whereas a longer mixing time was required for the Orvantis batter mixed with NEMI. On the other hand, without NEMI, all these batters developed after the same mixing time. This result, showing that NEMI was less effective for the Orvantis batter than for the two other batters, could suggest that the reaction [2] would be less prevalent in the case of Orvantis than in the case of Caphorn and Isengrain. It could be one of the reasons explaining why, at any given baseline torque, the time to optimally develop an Orvantis batter was always shorter than observed for batters of Caphorn and Isengrain (Chapter 2A).

The present results confirm the existence of reactions [1] and [2] of the Scheme (1) during all the mixing step. However, further experiments are needed to assess the balance between these reactions. From the important effect of NEMI on batter development time, we may however conclude that reaction [2] seems to be one of the key factors that control the duration of the lag phase and that it considerably slows down dough development in a batter.

III.4. Influence of mixing on gluten protein recovery

Gluten samples were extracted from the under-, optimally- and over-mixed batters. The evolution of the total gluten protein recovery (GPR) obtained on the three sieves during mixing is presented in Fig. 4A.4.

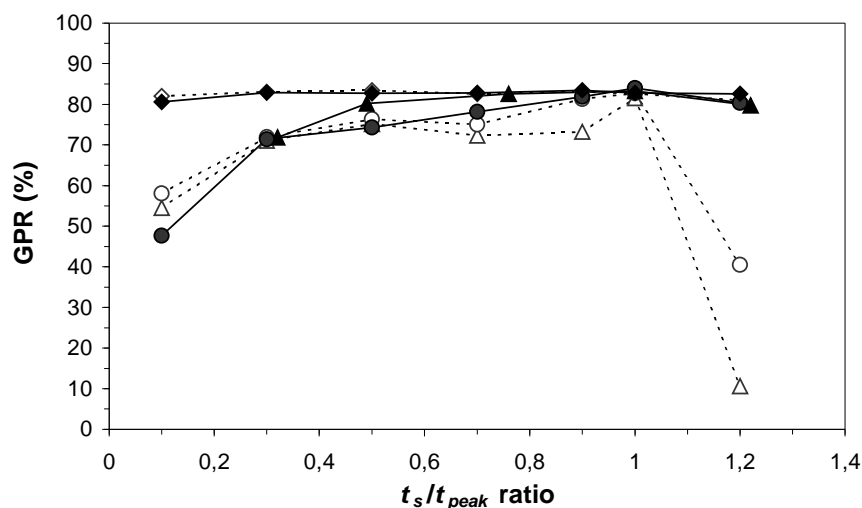


Fig. 4A.4. Evolution of the gluten protein recovery (GPR) during mixing. t_s is to the sampling time reported in Fig. 4A.1 and t_{peak} is the time for optimal dough development. Results from batters (◆,◇) Orvantis, (▲,△) Caphorn, and (●,○) Isengrain. For each cultivar, closed symbols are for the fast batters and open symbols are for the slow ones, see Fig. 4A.1.

Proteins were easily recovered from the two Orvantis batters, whatever the mixing conditions and the mixing time. Furthermore, the protein recovery was stable and very high (80–83%) during the entire mixing step for this cultivar. In contrast, large variations of GPR values were observed during mixing for the batters of Caphorn and Isengrain. For these batters, the evolution of GPR followed the batter mixing curve. The GPR increased from 45–58% at $0.1 t_{peak}$ to 70% at $0.3 t_{peak}$, in accordance with the first decay phase (see Fig. 4A.1). Then, the GPR tended to remain rather stable during the entire lag phase at around 70–75% (see slow batters of Caphorn and Isengrain in Fig. 4A.4). For the slow Caphorn batter, the GPR finally increased rapidly from $0.9 t_{peak}$ to the maximum torque, in accordance with the torque rise (see Fig. 4A.1). For the fast Caphorn batter, for which the torque rise began after $0.3 t_{peak}$, the GPR increased steadily from $0.3 t_{peak}$ to attain its maximal value at t_{peak} . So, for all the batters, torque rise favoured the final increase of protein recovery, which was maximal at t_{peak} . In contrast to under-mixing, during which the GPR increased with mixing time, the GPR decreased with mixing time during over-mixing. The drop was very important for the slow batters but was rather limited for the fast batters (Fig. 4A.4). For the slow batters, over-mixing even led to GPR values inferior to those obtained in under-mixing conditions. Thus, depending on the mixing condition and the flour used, over-mixing can lead to a more drastic loss of proteins than under-mixing.

As a general rule, the higher GPR, the higher GPR_{800} (Fig. 4A.5). Indeed, gluten samples extracted from under-mixed batters of Caphorn and Isengrain were initially distributed on the three sieves at the beginning of the mixing, and were then progressively accumulated on the 800 μm sieve as the GPR increased (Fig. 4A.5). In consequence, mixing induced the agglomeration of gluten proteins that can be followed by the increase of GPR_{800} . However, the values of GPR_{800} were not the same for the three cultivars during mixing. In contrast to Caphorn and Isengrain, all the gluten samples extracted from the Orvantis batters were always recovered on the 800 μm sieve, except at $0.1 t_{peak}$ for the fast mixing condition, *i.e.* after 4 min of mixing (Fig. 4A.1a). This result shows that the agglomeration of Orvantis proteins occurred very rapidly. In consequence, we might suggest that the fast agglomeration observed for the cultivar Orvantis resulted from a very high agglomeration capacity of its proteins, which lead to very large gluten agglomerates. Finally, while mixing induced the continuous and maximal agglomeration of gluten proteins until t_{peak} , over-mixing induced the disruption of the gluten network and its spreading over the three sieves (Fig. 4A.5).

As reported for the total GPR, only the slow batters of Caphorn and Isengrain were greatly affected by over-mixing, while the slow Orvantis batter and the fast batters did not.

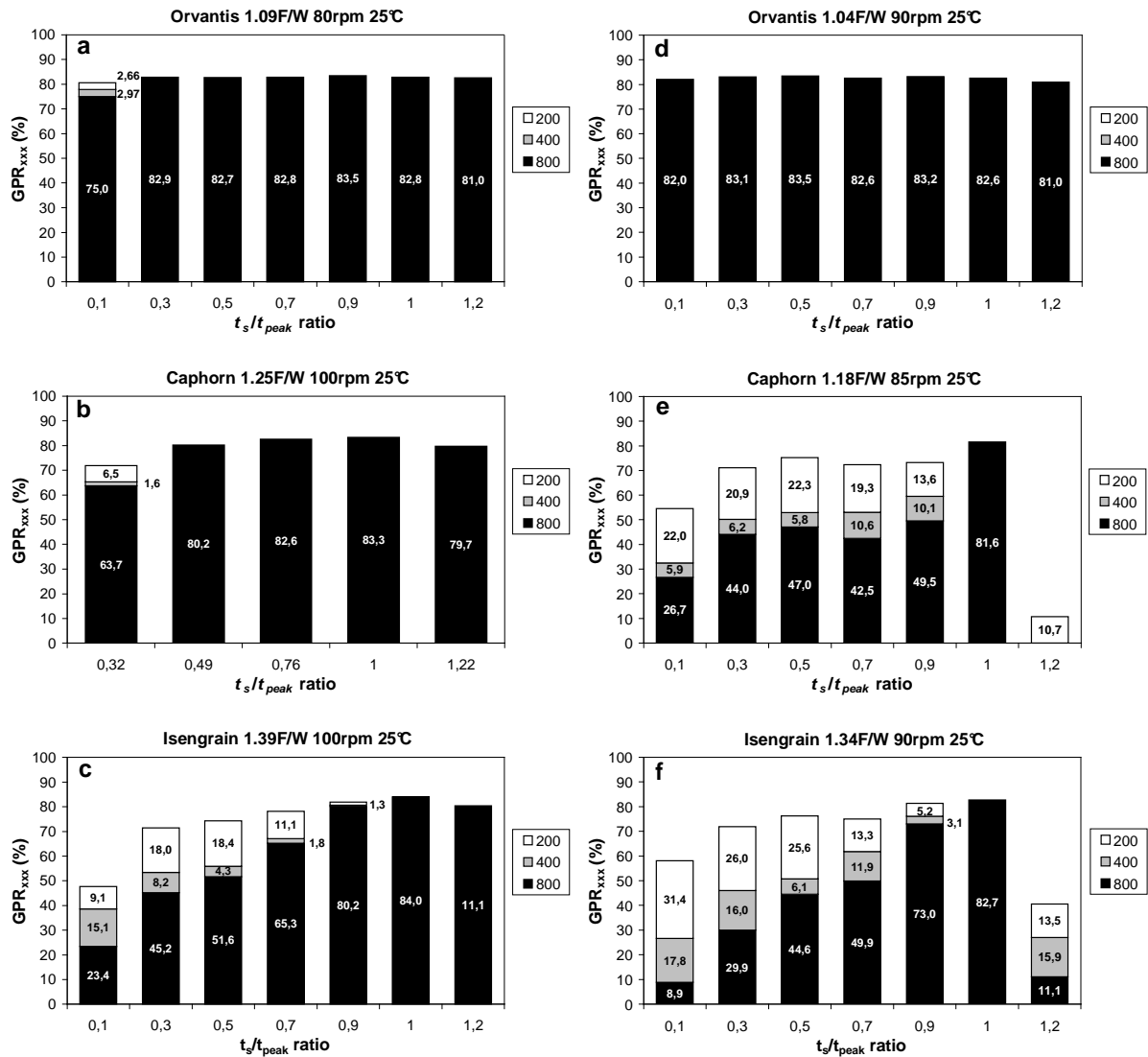


Fig. 4A.5. Evolution of the gluten protein recovery (GPR_{xxx}) obtained on each of the three sieves during mixing (black for 800 μm, grey for 400 μm and white for 200 μm). t_s is to the sampling time reported in Fig. 4A.1 and t_{peak} is the time for optimal dough development. (a-c) Fast batters are on the left and (d-f) slow batters on the right. See Fig. 4A.1 for mixing conditions.

III.5. Influence of mixing on glutenin, gliadin and albumin/globulin recovery

Fig. 4A.6a-c shows that glutenin recovery always exceeded gliadin recovery and even more exceeded albumin/globulin recovery. Glutenin recovery was especially high (> 85–95%) during the lag phase, followed by gliadin recovery (> 70–85%) and albumin/globulin recovery (> 50–60%). This is coherent with the decreasing average molecular size of these protein groups and their increasing water solubility.

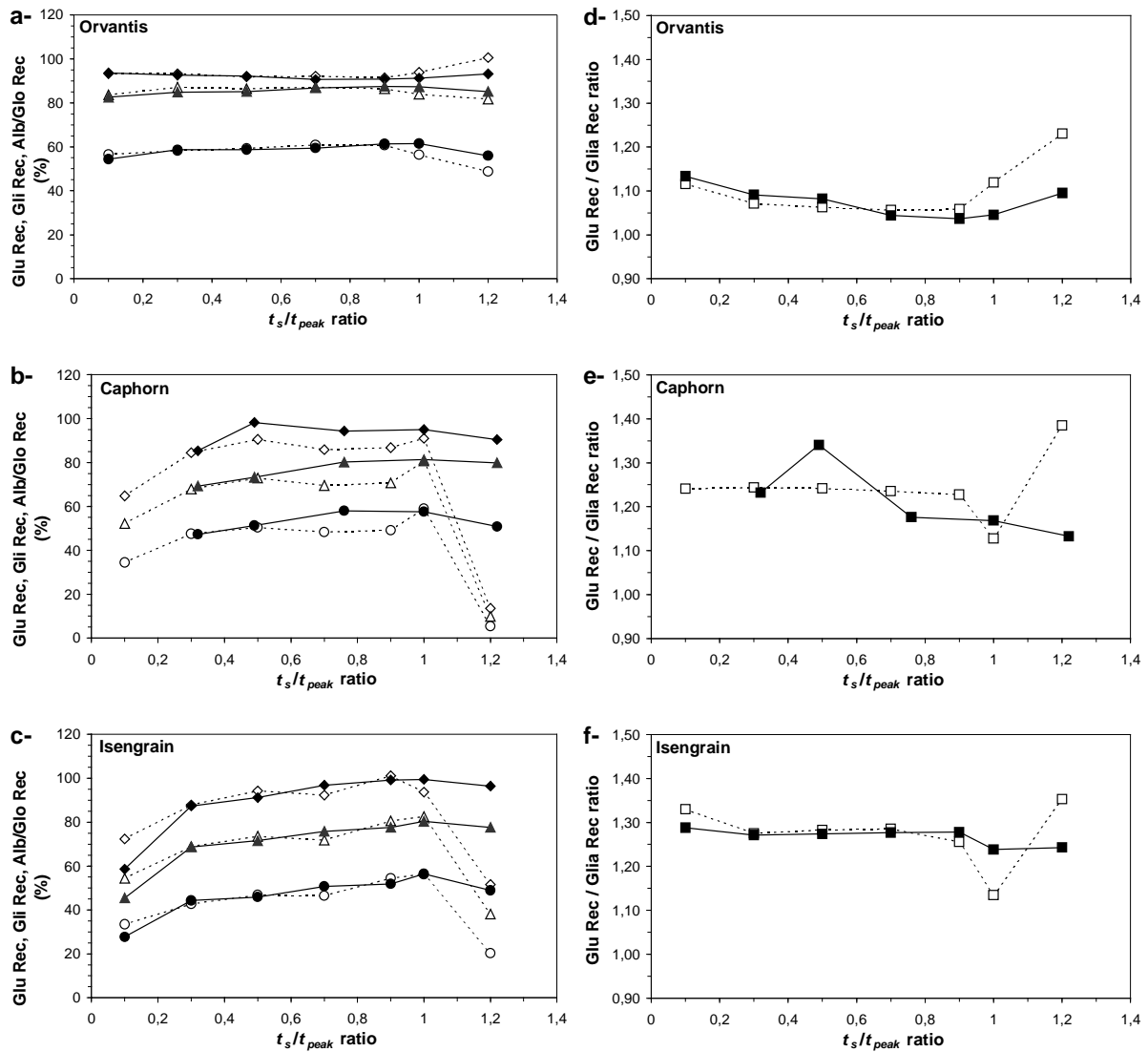


Fig. 4A.6. (a-c) Evolution of the gluten recovery in glutenin (Glu Rec; \blacklozenge, \diamond), gliadin (Gli Rec; $\blacktriangle, \triangle$) and albumin/globulin (Alb/Glo Rec; \bullet, \circ) during mixing. (d-f) Evolution of the Glu Rec/Gli Rec ratio during mixing. Closed symbols are for the gluten samples extracted from the fast batters and open symbols are for the gluten samples extracted from the slow batters. t_s is to the sampling time reported in Fig. 4A.1 and t_{peak} is the time for optimal dough development. Batters mixing conditions as in Fig. 4A.1.

From Figs. 4A.6a-c and 4A.4, it appears that the increase in recovery of all the protein groups was related to the continuous increase of GPR. Moreover, their evolution was exactly parallel between each protein group (Fig. 4A.6a-c). Therefore, for a same cultivar, the proportion of glutenin, gliadin and albumin/globulin into the gluten was exactly the same during the entire under-mixing phase. The Glu Rec/Gli Rec ratio was also very stable and similar during all the lag phase for the gluten samples extracted from slow batters of Caphorn and Isengrain (Fig. 4A.6e-f). Thus, the increase of GPR_{800} during the lag phase (Fig. 4A.4) was not related to a change in the protein composition of the gluten agglomerates.

In accordance, the gluten samples collected on the three sieves did not show any significant difference of their protein group distribution (*not shown*). At t_{peak} , similar Glu Rec/Gli Rec ratios were obtained from the slow batters Caphorn and Isengrain (1.12 and 1.13, respectively), but ratios were lower than during the lag phase. Simultaneously, a prompt increase in Alb/Glo Rec was also observed at t_{peak} for these batters (Fig. 4A.6b-c). We might suggest that the formation of the filamentous gluten network at t_{peak} , which increased the surface/volume ratio of the gluten phase, may have favoured the physical entrapment of the remaining proteins present in the water-starch suspension (gliadin, albumin and globulin), which did not take part in the structure of the gluten phase. Similarly, larger gluten agglomerates would also be able to entrap more soluble wheat proteins than smaller ones. It might be the reason why gluten samples extracted from under-mixed Orvantis batters showed a higher Alb/Glo Rec and a lower Glu Rec/Gli Rec than gluten samples extracted from Caphorn and Isengrain (Figs. 4A.6a and 4A.6d). Finally, over-mixing generally induced a loss of all the protein groups (Fig. 4A.6a-c). However, gliadin, albumin and globulin recovery was more affected by over-mixing and, as a general trend, the Glu Rec/Gli Rec ratio increased for all the slow batters (Fig. 4A.6d-f). For the fast batters, the effect of over-mixing was less obvious and concerned mainly the Alb/Glo Rec.

III.6. Influence of mixing on gluten protein content

The evolution of the gluten protein content (GPC) during mixing is presented in Fig. 4A.7.

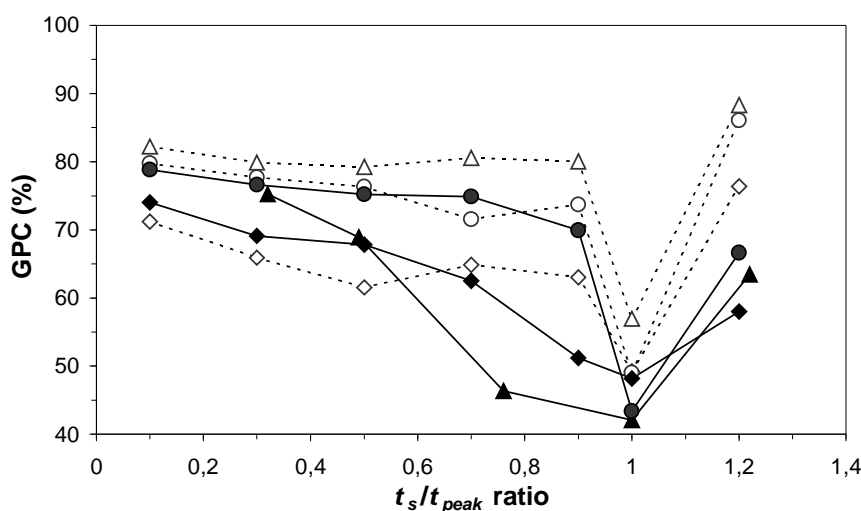


Fig. 4A.7. Evolution of the gluten protein content (GPC) during mixing. t_s is to the sampling time reported in Fig. 4A.1 and t_{peak} is the time for optimal dough development. Results from batters (◆,◇) Orvantis, (▲,△) Caphorn, and (●,○) Isengrain. For each cultivar, closed symbols are for the fast batters and open symbols are for the slow ones, see Fig. 4A.1.

The GPC, high at the beginning of mixing ($0.1 t_{peak}$), slightly decreased until $0.5 t_{peak}$ where it remained stable until the end of the lag phase (until $0.9 t_{peak}$ for the slow batters). When the gluten was distributed over the three sieves (under-mixed slow batters), the GPC was found to increase from the largest to the smallest sieve by 2-4% (*not shown*). Looking at the slow batters, we observed that the protein content of Orvantis glutes (70-63%) remained lower than those obtained for gluten samples of Caphorn and Isengrain (82-72%) during the lag phase. However, Orvantis glutes were always recovered on the 800 μm sieve (Fig. 4A.6d), in contrast to the gluten samples of Caphorn and Isengrain (Fig. 4A.6e-f). We previously suggested that Orvantis proteins could present a higher agglomeration capacity than proteins of Caphorn and Isengrain. This would result in larger gluten agglomerates, which could physically entrap more starch granules, resulting in a lower GPC value. Following the same reasoning, we have previously shown that, at the beginning of mixing, gluten particles merged into large micro-sized gluten lumps (**Chapter 2A**). We suggest that, as the gluten agglomerates grew, more and more starch granules became entrapped, explaining the initial decrease of GPC until $0.5 t_{peak}$ (Fig. 4A.7). In that respect, the growing of gluten lumps could persist until $0.5 t_{peak}$.

Then, GPC considerably decreased with the torque rise and reached its minimal value at t_{peak} exactly (Fig. 4A.7). The feature is manifest for the gluten extracted from the fast Caphorn batter, for which the torque rise started since $0.3 t_{peak}$. The developing filamentous gluten network seems to have physically entrapped the starch granules very efficiently, but also the remaining soluble proteins, as we supposed above. At t_{peak} , the GPC was higher for gluten samples extracted from the slow batters than those extracted from the fast batters, in accordance with our previous results (**Chapter 3A**). In over-mixing conditions, the gluten purity largely increased. It is not clear whether if the starch granules leached from the filamentous gluten network because it was completely disrupted during over-mixing or if gluten strands, which may have become thinner in over-mixing, were disrupted during the washing phase. This point needs further experiments. However, a real disruption of gluten strands occurring directly during over-mixing would have decreased the mixing torque during over-mixing more than observed in Fig. 4A.1. As the torque values recorded in over-mixing were always larger than those recorded during under-mixing, where the gluten network was not yet connected, we suggest that over-mixing led to lengthening of the gluten strands.

III.7. Influence of mixing on gluten SDS-insoluble glutenin content

The evolution of the SDS-insoluble glutenin (Fi) content of gluten samples extracted during batter mixing is presented in Fig. 4A.8a.

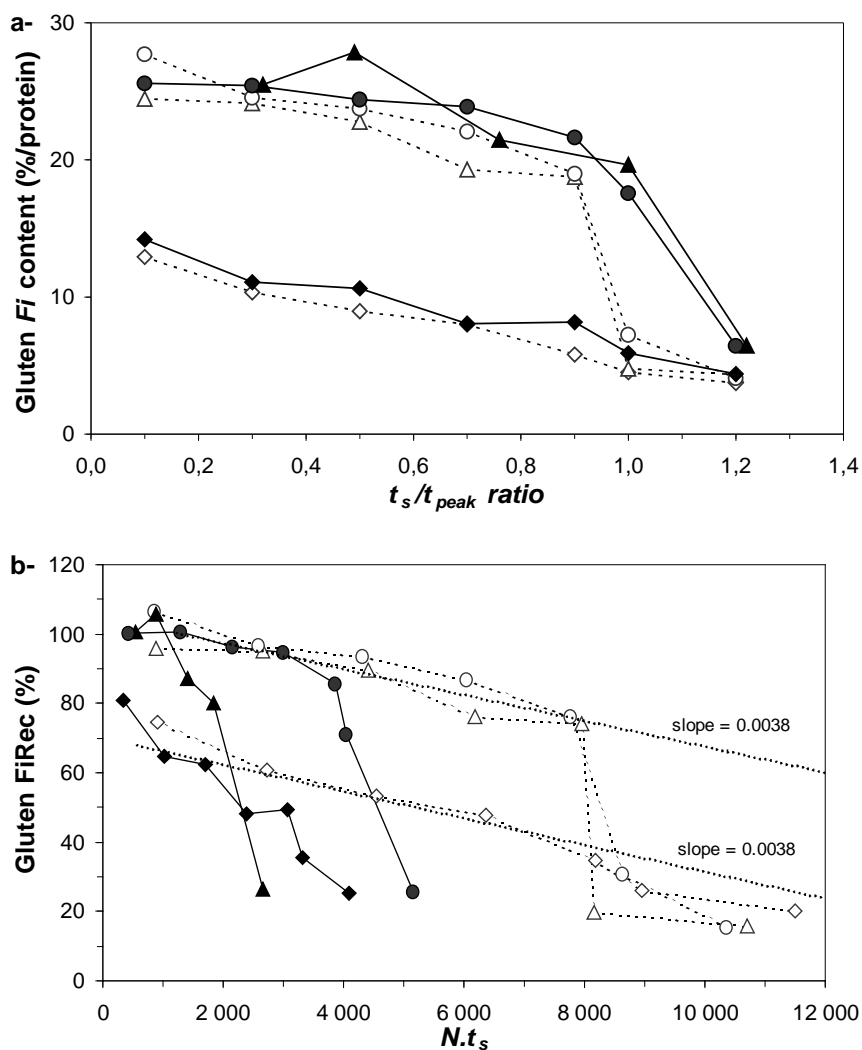


Fig. 4A.8. (a) Evolution of the gluten SDS-insoluble glutenin (Fi) content during mixing. t_s is to the sampling time reported in Fig. 4A.1 and t_{peak} is the time for optimal dough development. (b) Evolution of the gluten recovery in SDS-insoluble glutenin (Gluten $FiRec$) in function of the number of mixing revolutions ($N.t_s$). Results from batters (◆,◇) Orvantis, (▲,△) Caphorn, and (●,○) Isengrain. For each cultivar, closed symbols are for the fast batters and open symbols are for the slow ones, see Fig. 4A.1.

For all the mixing conditions, the Fi content of gluten was always larger than the Fi content of the batter it was derived from (Figs. 4A.8a and 4A.2a). The feature demonstrates without ambiguity that a re-assembly of SDS-soluble glutenin polymers occurred during gluten extraction. The re-assembly event was large and obvious for gluten samples of Isengrain and Caphorn whereas it remained less evident for Orvantis glutes (Fig. 4A.8a).

Moreover, for all the mixing conditions and flour used, the gluten Fi content progressively decreased during mixing, before undergoing a prompt decrease in the range of 0.9 to 1.2 t_{peak} . This result suggests that mixing irreversibly affected the amount of SDS-insoluble glutenin in gluten.

In a previous study dealing with several optimally developed batters (**Chapter 3A**), we have shown that the number of mixing revolutions and the wheat cultivar controlled the recovery of SDS-insoluble glutenin in the extracted gluten (gluten $FiRec$). In consequence, gluten $FiRec$ data were plotted against the number of mixing revolutions ($N.t_s$) in Fig. 4A.8b. For gluten samples extracted from all the slow batters, it is clear that gluten $FiRec$ decreased linearly with $N.t_s$ during the lag phase. Moreover, the slope of the decrease was similar for the three cultivars. The feature is in total agreement with the existence of a reaction [3] in the Scheme (1) during the overall mixing phase. The situation is more ambiguous for gluten samples extracted from the fast batters where the lag phase was shorter. Nevertheless, the continuous decay of gluten $FiRec$ during the lag phase seems also to be the rule (see gluten samples extracted from the fast Isengrain batter in Fig. 4A.8b).

A brusque and important drop of gluten $FiRec$ occurred exactly few minutes before t_{peak} for the gluten samples extracted from the slow batters, as the torque increased. The filamentation of the gluten lumps is a drastic event, which irreversibly impaired the re-assembly capacity of the large glutenin polymers. At t_{peak} , the Fi contents recorded for gluten samples extracted from the slow batters approximated those of the batters (Figs. 4A.2b and 4A.8a), indicating an irreversible loss in Fi recovering capacity. The same feature was noticeable for the gluten samples extracted from the fast batters but it occurred only after t_{peak} (Fig. 8b). Such a difference between gluten samples extracted at t_{peak} from the slow and fast batters could be anticipated from our previous work (**Chapter 3A**). Indeed, we showed that the number of mixing revolutions required to attain the optimal dough development ($N.t_{peak}$) negatively impacted the gluten $FiRec$ at t_{peak} .

However, the present study shows that the impact of the number of mixing revolutions ($N.t_s$) on gluten $FiRec$ differed if the gluten was extracted at t_{peak} or during the lag phase. Indeed, for a same $N.t_s$ value of ca. 2660, the gluten $FiRec$ was greatly lower (26%) for the gluten extracted under its filamentous form, from the fast Caphorn batter at 1.2 t_{peak} , than extracted under its agglomerate form, from the slow Caphorn batter at 0.3 t_{peak} (95%) (Table 4A.2). This result highlights the harsh effect of the gluten filamentation on the re-assembly capacity of SDS-insoluble glutenin polymers.

Table 4A.2. Influence of the degree of dough development on the gluten recovery in SDS-insoluble glutenin (Gluten FiRec) for a similar number of mixing revolutions ($N.t_s$)

Wheat cultivar		$N.t_s$ * (rpm.min)	t_s/t_{peak} *	Gluten FiRec (%)
Caphorn	Slow	2652	0.3	95
	Fast	2665	1.2	26
Isengrain	Slow	4320	0.5	93
	Fast	4050	1	71

* N is the mixing speed, t_s is the sampling time and t_{peak} is the time for optimal dough development

Once again, Orvantis presented contrasting results compared to the two other cultivars. An important initial drop of gluten FiRec (40%) preceded the steady gluten FiRec decrease that occurred during the lag phase (Fig. 4A.8b). The feature can be related to the significant drop of gluten FiRec we have previously reported for the Orvantis glutes extracted from optimally developed batters at low $N.t_{peak}$ (**Chapter 3A**). In order to account for the phenomena, we have introduced a reaction [4] in the Scheme (1). The present study shows that this reaction, leading to an irreversible loss in Fi recovering capacity, occurs from the beginning of mixing. This rapid irreversible breakdown of SDS-insoluble glutenin polymers might explain the very fast kinetic of Fi breakdown observed for the two Orvantis batters (Fig. 4A.2a) and the lower effect of NEMI on the mixed Orvantis batter (Fig. 4A.3).

IV. Discussion

Recently, we reported (**Chapter 3A**) that extracting gluten from optimally developed batters guarantee a protein recovery of ca. 82%, whatever the mixing condition used. The present work confirms this value and shows that gluten protein recovery is always maximal at t_{peak} (Fig. 4A.4). In contrast, the purity of gluten samples in protein is minimal at t_{peak} (Fig. 4A.7). Surprisingly, the gluten protein recovery and purity values are always antagonist during the entire mixing step: as the gluten protein recovery increases during under-mixing, the gluten purity decreases and, as the gluten protein recovery decreases during over-mixing, the gluten purity increases (Figs. 4A.4 and 4A.7). This result clearly shows that the degree of dough development affects the gluten protein recovery and purity, in accordance with our previous suggestions (**Chapter 3A**). However, what affects the degree of dough development? Present results, in combination with our previous studies (**Chapters 2A and**

3A), can open a large discussion on the importance of the agglomeration and filamentation of gluten proteins on the mechanisms of dough development and on the influence of dough water content on these mechanisms.

First of all, we are going to define what we call dough development. As shown previously (**Chapter 2A**) and in agreement with the results presented in Fig. 4A.5, the gluten phase in batters can be distributed in the form of agglomerates or strands. Gluten lumps, formed after the hydration of the initial small flour protein particles, exist during the entire under-mixing phase but totally vanish at t_{peak} to the benefit of gluten strands that span the entire dough mass. In the latter state, the batter exhibits its classical visco-elastic properties, whereas it behaves like a complex suspension of deformable gluten lumps and rigid starch granules all along the under-mixing phase (**Chapter 2A**).

We gave evidence that batter development relies on the breakdown of the flour SDS-insoluble glutenin polymers (Fig. 4A.2a). In parallel to this breakdown, the size of gluten agglomerates increases progressively (GPR_{800} in Fig. 4A.5), showing that the agglomeration capacity of gluten proteins increases as batter Fi drops. At the same time, the protein composition of the gluten agglomerates (proportion of glutenin, gliadin and soluble proteins) remains rather constant (Fig. 4A.6), pointing out a stable composition of the gluten particles present since the very beginning of mixing and suggesting that a relationship between glutenin and gliadin already preexists within the flour protein bodies. We might suggest that those initial gluten particles, presenting a fixed glutenin/gliadin ratio, can be considered as elementary gluten bricks, which agglomerate during mixing to form larger gluten lumps. The ability of these gluten bricks to agglomerate seems to rely on the structure of the large glutenin polymers, which might constitute the “rigid” core of the gluten particles. As the SDS-insoluble glutenin polymers are broken down during mixing, the deformability and sticking properties of the gluten agglomerates should be increased, thereby facilitating their merging into larger gluten lumps upon collision and deformation. In that respect, gluten elasticity has already been related to the amount of SDS-insoluble glutenin polymers in gluten (Cornec et al., 1994; Popineau et al., 1994; Lefebvre et al., 2000), and gluten was already shown to exhibit the properties of a pressure sensitive adhesive (Heddleson et al., 1993; Pommet et al., 2005). Therefore, decreasing the amount of Fi fractions of the gluten agglomerates during mixing decreases their elasticity. It results in increasing their agglomeration capacity by increasing the number of effective interactions between the more

and more sticking gluten agglomerates and their close environment, *i.e* starch granules and other gluten lumps. It finally leads to an increase in protein recovery but also to a decrease in gluten protein content, as the batter Fi drops (Figs. 4A.4 and 4A.7).

However, the size increase of gluten lumps is not sufficient to optimally develop a batter. For that, we have shown that the discrete gluten lumps must turn into connected strands (**Chapter 2A**). The physico-chemical basis of this profound structural change will need further work before being elucidated. In the following, our hypothesis is that Fi breakdown facilitates the mixing-induced conversion of micro-sized gluten lumps into gluten strands. At t_{peak} , the molecular size of glutenin is shifted toward the molecular size of gliadin, which was already shown to arrange spontaneously into protein fibrils after hydration (MacMaster et al., 1999). As the mixing torque continuously decreases in over-mixing condition, remaining however still higher than during under-mixing (Fig. 4A.1), we suggest that gluten strands become thinner as over-mixing continues. Therefore, thinner gluten strands would be more easily disrupted during the washing step, leading to the spreading of the gluten phase as protein fibrils dispersed on the three sieves, and to the increase of gluten protein content by an easy leaching of starch from the filamentous gluten network (Figs. 4A.5 and 4A.7).

In batter, the breakdown of flour SDS-insoluble glutenin seems to be the result of the balance of at least three reactions, occurring during mixing. At first, glutenin breakdown is induced by the mixing stress and the reaction rate is likely to be proportional to the mixing torque level (**Chapter 2A**). This is the primary reaction quoted as [1] in Scheme (1). This reaction is counteracted by its reverse, which leads to the recovery of the SDS-insoluble glutenin (reaction [2] in Scheme 1). Change in the disulfide crosslinking status of the glutenin polymers seems to be involved during the reactions [1] and [2]. This was proven by the rapid Fi breakdown and by the shorter mixing times observed in the presence of NEMI (Fig. 4A.3). Similar investigations and results can be found in a recent paper of Peressini et al. (2007). Like these authors, we also observed that NEMI hindered further glutenin re-assembly during gluten extraction (*not shown*). This indicates that NEMI interacts with the glutenin thiols.

In the dilute and slack batters, the mixing stress remains very low and the reaction [1] would be easily balanced by the reaction [2], which was showed to play an important role in batter development time (Fig. 3). In the absence of another reaction, batter mixing would only lead to a weak breakdown of Fi fractions and no dough development would happen. It is the

reaction [3] of Scheme (1), which in fact drives the batter development. This reaction leads to an irreversible loss of glutenin re-assembly capacity. During the lag phase, the similar decays of gluten Fi_{Rec} observed for all the batters studied (Fig. 4A.8b) suggest that the reaction rate is independent to the batter composition and to the extent of batter Fi breakdown (pseudo zero-order reaction). We have previously proposed that the reaction [3] could involve the irreversible oxidation of the glutenin thiols by some reactive oxygen species or by their derivatives (**Chapter 3A**). Moreover, change in dough structure due to the filamentation of gluten lumps further increases the rate of this reaction [3] (Fig. 4A.8b). It is possible that the massive filamentation of gluten lumps includes more air and oxygen into the gluten network, or that the increasing gluten surface in contact with air due the filamentation increases its oxidation.

A last reaction is also possible to rapidly prevent the re-assembly of SDS-insoluble glutenin. However this reaction, quoted [4] in Scheme (1), is specific of the cultivar Orvantis and does not occur for the cultivars Caphorn and Isengrain. We have previously proposed that the reaction [4] could be induced by the presence of a specific constituent in the Orvantis flour (**Chapter 3A**), but the knowledge of this reaction is at its beginning. This reaction gives to the cultivar Orvantis some special mixing characteristics, especially well adapted to batter mixing: it allows a fast batter Fi breakdown (Fig. 4A.2a), which is responsible to the high agglomeration capacity of the Orvantis proteins, to the high protein recovery obtained since the beginning of mixing, and to the fast dough development observed previously for this flour (**Chapter 2A**).

For the slow Orvantis batter, and for all the dilute batters studied here, the filamentation phase, which ensures the massive transition of gluten lumps to gluten strands, is only possible when all the flour SDS-insoluble glutenin polymers are broken down during under-mixing (Fig. 4A.2a), which can be assimilated to a maturation phase. In such dilute mixing conditions, the batter Fi breakdown is mainly induced by the reaction [3], plus the reaction [4] for Orvantis batters (Figs. 4A.2a and 4A.8b). In contrast, as the batter consistency increases for the fast batters, by decreasing the batter hydration, the filamentation phase begins to start earlier during the mixing process, and for higher batter Fi contents (Fig. 4A.2a). Therefore, breaking down the entire pool of flour SDS-insoluble glutenin is not necessary to initiate the filamentation phase for these more consistent batters. For the latter, and as the batter consistency increases, the prevalence of reaction [3] decreases (Fig. 4A.8b) to the benefit of reaction [1]. Indeed, the mixing stress increases as the mixing torque

increases, and the mixing torque increases by decreasing the batter hydration, but also by the occurrence of the filamentation phase (Fig. 4A.1). Hence, the filamentation phase is responsible for the acceleration of the Fi breakdown observed for the more consistent batters (Fig. 4A.2a) and it results in the same floor value of batter Fi content at t_{peak} . This strongly cooperative torque rise observed for the more concentrated batters indicates that an extensive gluten filamentation is possible as soon as a critical amount of gluten lumps or strands start to interact. The probability to obtain this critical amount of protein interactions is very high for the more concentrated batters, but considerably decreases for the more dilute ones, as the diluting action of added water increases the distance between gluten agglomerates. For the more slack batters, a long maturation phase, chemically or enzymatically driven, seems to be consequently necessary to reach a sufficient deformation of gluten lumps to allow their physical connection into gluten strands.

This discussion dealing about the difference between consistent and slack batters can be extended to the difference existing between bread dough and batter, according to the mechanisms of dough development. Indeed, the main difference between batter and bread dough development seems to be related to the proximity of gluten particles. In the more consistent bread dough, the maturation phase is not visible and the filamentation phase occurs very rapidly. In such concentrated system, initial gluten particles seem to be sufficiently close to each other to interact as soon as they are hydrated. If, and we may suppose that it is the case because of their standard composition, the gluten particles swell at the same rate, a site percolation network can be formed almost immediately in bread dough, thanks to the close contact of hydrated gluten particles. Upon further intensive mixing, the gluten particles could rapidly turn into filaments. At the same time, the amount of SDS-insoluble glutenin in dough drops rapidly as the filaments undergo the large deformations implied by mixing a visco-elastic network. In bread dough, the role of reactions [3] and [4] of Scheme (1) seems to be negligible for the control of dough development, as we suggested above that the filamentation phase only starts from the percolation of close hydrated gluten particles and does not require any maturation phase. Nevertheless, we may suppose that reactions [3] and [4] seem to have an impact on the dough breakdown rate that occurs during over-mixing (Don et al., 2005b). The results reported by Peighambardoust et al. (2006a) on zero-developed bread dough seem to be in accordance with this hypothesis. These authors showed, by confocal microscopy, that zero-developed bread dough, obtained by blending flour and ice without mixing energy, resulted in an even distribution of gluten particles. Moreover, when mixed in a z-blade arm

mixer, the optimal dough development time was 33 to 85% shorter for the zero-developed dough than for the reference flour-water mixture, depending on the flour used. Furthermore, these authors reported that the reformation of glutenin macro-polymer into the zero-developed dough - an event corresponding to the reformation of SDS-insoluble glutenin - was strongly hindered in over-mixing condition compared to the reference, as the mixing torque decreased more rapidly. According to our hypotheses, in situ hydration of gluten particles by ice should already have induced the close contact between hydrated gluten particles before mixing. This allowed to obtain the immediate spreading of the gluten network and to obtain shorter dough development times than the reference dough, which required more time and energy to hydrate and squeeze its gluten particles to gluten strands. Therefore, reaction [3] of Scheme (1) could occur more efficiently during over-mixing of the zero-developed dough, leading to the earlier loss in the recovery of SDS-insoluble glutenin they observed in rested dough.

In contrast to the bread dough, for which optimal gluten network development would be initiated through a site percolation, *i.e* from the close contact between gluten particles, the gluten network formation in batter seems to be mainly initiated through a bond percolation, *i.e* from the contact between gluten strands. However, the final result will be the same at t_{peak} : a network of gluten strands spanning the entire dough mass (Amend and Belitz, 1991; Auger et al., 2007). The rheological properties of the dough, bread or batter, should then rely on the width of the gluten strands. The more the batter will be diluted, the thinner would be the gluten strands, and the more plastic and deformable would be the dough.

V. Conclusion

In this work we examined some physico-chemical changes happening during batter development. From our previous study (**Chapter 2A**), we knew that micro-sized gluten lumps turned into filaments as the torque rose to peak development. Here, we showed that gluten lumps can be recovered progressively as agglomerates on the sieves from 200 to 800 μm , after a gentle and standard diluting and washing step. The average size of the agglomerates increased with the mixing duration, thus resulting in higher protein recoveries in gluten. Gluten agglomerates recovered during mixing presented a constant content in glutenin, gliadin and soluble proteins, suggesting that gluten agglomeration resulted from the accumulation of elementary gluten bricks present in the initial gluten particles. During

mixing, the total breakdown of SDS-insoluble glutenin polymers was required to reach optimal dough development.

The general mechanism proposed in **Chapter 3A** and reported in Scheme (1) to account for the breakdown and re-assembly of flour SDS-insoluble glutenin was ascertained during mixing in the present study. This mechanism contains four reactions (Scheme (1)). Three reactions allow the breakdown of SDS-insoluble glutenin: the mechanically driven reaction [1], favoured by the mixing stress, the chemically driven reaction [3], favoured by the number of mixing revolutions, and the chemically driven reaction [4], which is specific of Orvantis and would be favoured by the presence of a flour constituent which was not identified here. However, the mechanically driven reaction [1] is counteracted by the reverse reaction [2], which induces the reformation of SDS-insoluble glutenin polymers. Mixing experiments with NEMI provided evidence that change in the thiol status of glutenin polymers may account for their breakdown and reformation during mixing.

In this study, we discussed how this general mechanism could be applied to batters and bread doughs in a way to better understand how dough development occurs. The main difference between these two kinds of systems is the difference in dough consistency, which would imply different balances between the four reactions proposed in Scheme (1). For the more consistent doughs, such as bread dough, the optimal dough development was mainly mechanically driven. Indeed, high consistency of dough induced high mixing stress, which induced a rapid breakdown of SDS-insoluble glutenin by the reaction [1]. In such consistent doughs, the filamentation of gluten agglomerates arose from the direct bonding of hydrated flour particles, in close contact in such concentrated doughs. For the more dilute doughs, such as batter, the optimal dough development was mainly chemically driven. Indeed, low consistency of dough reduced the mixing stress and the total breakdown of SDS-insoluble glutenin was indirectly performed by the reaction [3]. In such dilute batters, the massive filamentation of gluten lumps arose from the bonding of gluten strands. However, the transition from gluten lumps to gluten strands relies on a physico-chemical mechanism that remains to be better understood.

RESUME/CONCLUSION

Cette étude montre que les protéines du gluten s'agglomèrent progressivement tout au long du pétrissage pour atteindre un degré d'agglomération maximal à t_{peak} . Par l'hydratation des protéines et l'énergie mécanique apportée, le pétrissage permet donc d'augmenter la capacité d'agglomération et le "collant" des protéines du gluten. Cela se traduit d'ailleurs par une diminution progressive de la pureté des glutens en protéines durant la totalité du pétrissage.

De plus, en accord avec les résultats obtenus dans le **Chapitre 3B**, cette étude suggère que l'augmentation de la capacité agglomérante du gluten serait le résultat immédiat de la dépolymérisation des polymères de gluténine insolubles dans le SDS se produisant au cours du pétrissage. A ce propos, cette étude confirme que la teneur de la pâte en polymères de gluténine insolubles dans le SDS est le résultat d'un équilibre entre les quatre mécanismes présentés initialement dans le **Chapitre 3A** et dont l'existence au cours de la totalité du pétrissage est vérifiée dans le présent chapitre.

Chapitre 4B – Influence du procédé de pétrissage sur la cinétique d'agglomération des protéines du gluten *in situ* dans la pâte

OBJECTIF

Le suivi du degré d'agglomération des protéines du gluten au cours du pétrissage a été étudié dans le chapitre précédent après l'extraction du gluten par lixiviation de la pâte. Les résultats obtenus ont montré que la durée de pétrissage augmente la capacité d'agglomération des protéines. Une augmentation continue du rendement d'extraction du gluten sur les tamis les plus larges a été observée jusqu'à l'optimum de développement de la pâte. Au vu de ces résultats et de ceux révélés par la coloration spécifique des protéines sur la structure du gluten au sein d'une pâte diluée (**Chapitre 2A**), nous serions tenter de conclure que le pétrissage provoque l'augmentation de taille des agrégats de gluten. Toutefois, les photos présentées dans le **Chapitre 2A** n'ont pas été analysées de façon quantitative. De plus, elles ne couvraient pas l'étape de sur-pétrissage. Dans le **Chapitre 4A**, nous avons suggéré que le sur-pétrissage pourrait provoquer l'amincissement puis la rupture des filaments de gluten qui apparaissent au voisinage de l'optimum de pétrissage. Cette hypothèse reste également à être validée.

En complément des **Chapitres 2A** et **4A**, le présent chapitre a donc pour objectif de suivre de façon qualitative mais surtout quantitative les évolutions de taille, de nombre et de forme des protéines au sein de la pâte à la fois en sous- et sur-pétrissage. Cette étude s'intéresse également à l'influence des conditions de pétrissage (hydratation et vitesse) et à l'influence de la variété de farine utilisée (Orvantis, Caphorn et Isengrain) sur cette évolution. Il s'agit notamment de déterminer si la taille des agrégats de gluten de la variété Orvantis est supérieure à celles des variétés Caphorn et Isengrain, comme suggéré dans le **Chapitre 4A**.

I. Matériels et Méthodes

I.1. Farines utilisées

Une nouvelle récolte (France, 2006) des trois variétés de blé utilisées dans les chapitres précédents (Orvantis, Caphorn, Isengrain) a été utilisée dans cette étude. La mouture a été effectuée sur un moulin Bühler (MLU 202, Bühler, Suisse) selon la méthode 26-31 de l'AACC (2000). Les teneurs en eau et en cendres ont été déterminées selon les méthodes 44-15A et 08-01 de l'AACC (2000). La teneur en protéines ($N \times 5.7$) a été obtenue par la méthode Kjeldahl. Enfin, les teneurs en arabinoxylanes solubles (WEAX) et en arabinoxylanes totaux ont été obtenues selon la méthode proposée par Rouau et Surget (1994). Les protéines de la farine ont été fractionnées par SE-HPLC selon la méthode proposée par Morel et al. (2000) et présentée en détail dans le **Chapitre 3A** pour déterminer la proportion de gluténine insoluble dans le SDS (Fi). Les données biochimiques obtenues sur les trois farines sont présentées dans le tableau 4B.1. Comme observé pour les variétés de la récolte 2004 (**Chapitres 2A, 3A et 4A**), Orvantis reste pauvre en fractions Fi , comparé aux deux autres variétés, mais présente des teneurs en AX aussi élevées que Caphorn. Par contre Isengrain présente des teneurs en AX beaucoup plus faibles que les deux autres variétés. Les teneurs en protéine sont supérieures à celles relevées en 2004, tout comme les teneurs en fractions Fi . A ce propos, le classement des farines par rapport à leur teneur croissante en fractions Fi est à présent le suivant: Orvantis, Isengrain et Caphorn.

Table 4B.1. Caractéristiques des farines

Wheat cultivar	Extraction rate (%)	Dry matter (%)	Ash (% db)	Protein (% db)	WEAX (% db)	Total AX (% db)	Fi (% / protein)
Orvantis	73.02	85.49	0.48	11.17	0.60	2.10	17.85
Caphorn	73.24	85.72	0.51	11.00	0.71	1.96	25.67
Isengrain	75.26	84.87	0.43	11.51	0.37	1.45	24.84

1.2. Conditions de pétrissage

Les pâtes (550g) ont été pétries à 25°C sur le pétrin P600 (Brabender OHG, Allemagne) en présence d'un colorant spécifique des protéines (Fast Green, Sigma, Allemagne). Pour chaque condition de pétrissage testée, 0.896 mg de Fast Green / g de protéine de la pâte ont été ajoutés directement dans l'eau d'empâtage. Pour chaque condition de pétrissage, nous avons vérifié que l'ajout de ce colorant n'avait strictement aucune influence sur la courbe de développement de la pâte.

L'influence des conditions de pétrissage a été étudiée sur la variété Isengrain, dont le suivi de la coloration des protéines avait déjà été présenté dans le **Chapitre 2A**. Quatre pâtes Isengrain ont été obtenues à 90 rpm en faisant varier uniquement le ratio farine/eau (1.38, 1.34, 1.31 et 1.26), et une pâte Isengrain a été obtenue à 60 rpm pour le ratio farine/eau (F/W) de 1.38. Les ratios F/W ont été choisis par analogie à ceux utilisés pour cette même variété dans le **Chapitre 2A**. La vitesse de pétrissage de 60 rpm a été choisie pour être suffisamment plus faible que la référence (90 rpm), tout en autorisant un temps de développement qui ne dépasse pas 4h, ceci pour des raisons pratiques. Les deux autres farines, Orvantis et Caphorn, ont été pétries à la même vitesse (90 rpm) mais à des ratios F/W différents de façon à obtenir une consistance de base identique à celle obtenue pour la pâte Isengrain 1.31 F/W 90 rpm. Ceci dans le but de comparer, pour différentes variétés de farine, la taille des agrégats de gluten dans les mêmes conditions de viscosité de la pâte et de vitesse de pétrissage.

Pour les sept conditions de pétrissage étudiées, le temps de développement optimal de la pâte (t_{peak}) a été déterminé au préalable sans aucun arrêt du pétrin. Au cours d'un second pétrissage, le pétrin a été stoppé pendant 30 secondes à 0.03-0.1-0.3-0.5-0.7-0.9-0.93-1.0-1.2-1.5 t_{peak} afin de prélever une cuillère à café de pâte pour effectuer des observations macroscopiques. Les prélèvements ont été établis de façon à couvrir la totalité des différentes phases de développement de la pâte.

La répétabilité des prélèvements a été testée sur la pâte Isengrain 1.34 F/W 90 rpm. Pour cela, trois pétrissages successifs ont été réalisés, au cours desquels les différents prélèvements de pâte ont été effectués et analysés comme suit.

1.3. Mise en place des échantillons et prise d'images

La méthodologie utilisée pour effectuer les prélèvements de pâte et les mettre en situation pour la prise d'images est celle décrite dans le **Chapitre 2A**. Les images ont été obtenues en utilisant un appareil photographique reflex numérique (EOS 20D, Canon, Japon) équipé d'un objectif macro de 105 mm (Canon, Japon). La prise d'images a été effectuée sous lumière blanche (5200 K), dans des conditions d'éclairage standardisées par deux néons fluorescents (TC-L36W, Osram Dulux, Italie). La résolution de la série d'image présentée est de 7 μm par pixel.

1.4. Analyse des images

Chaque image obtenue est un rectangle de 2 x 1 cm qui contient exactement 4 010 112 de pixels (2832 x 1416 pixels). Les images, prises en couleur (RGB), ont d'abord été converties au format 8 bit par le logiciel Image J (version 1.38a, logiciel public développé par l'Institut National Américain de la Santé, NIH), qui a servi d'outil à l'analyse entière des images. Sous ce format, chaque pixel de l'image présente un niveau de gris (grey level, GL) qui varie de 0 (noir) à 255 (blanc). L'exemple d'un histogramme des niveaux de gris, qui trace l'évolution de la distribution en nombre des pixels pour chacun des niveaux de gris, est présenté en Fig. 4B.1 pour la pâte Isengrain 1.34 F/W 90rpm prélevée à $0.5 t_{peak}$ (Fig. 4B.2a).

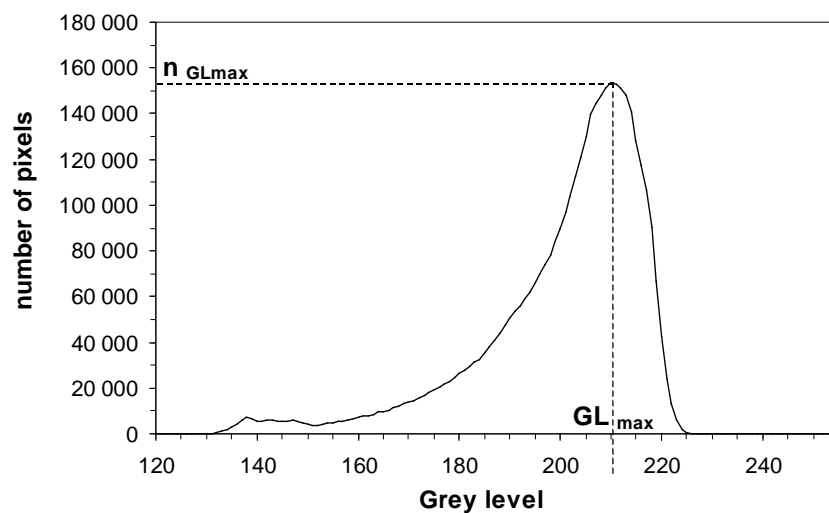


Fig. 4B.1. Histogramme des niveaux de gris obtenu pour la pâte Isengrain 1.34 F/W 90rpm prélevée à $0.5 t_{peak}$.

Cet histogramme, typique de toutes les images obtenues dans cette étude, fait apparaître un pic principal caractérisé par un niveau de gris maximal (GL_{max}) et par le nombre de pixels présentant ce niveau de gris ($n_{GL_{max}}$) (Fig. 4B.1). La valeur de GL_{max} renseigne sur le niveau de gris général de l'image. Plus GL_{max} est élevé, plus l'image tend vers le blanc. Au contraire, une valeur de GL_{max} plus faible signifie que l'image est plus sombre. La valeur de $n_{GL_{max}}$ renseigne sur le contraste global de l'image. Une valeur élevée de $n_{GL_{max}}$, qui s'accompagne toujours d'un resserrement de la distribution puisque le nombre de pixels de l'image est constant, signifie qu'une grande majorité de pixels présente un même niveau de gris. L'image est alors peu contrastée. Au contraire, une valeur plus faible de $n_{GL_{max}}$ signifie que la distribution des niveaux de gris est plus large. L'image est alors plus contrastée.

L'histogramme présenté ci-dessus présente également un pic très aplati entre les GL 130 et 150. En accord avec l'image d'origine présentée dans la Fig. 4B.2a, ce premier pic correspond au cœur des agrégats de gluten les plus sombres présents sur l'image. Afin de se focaliser sur ces agrégats et de suivre leur évolution en nombre et en taille au cours du pétrissage, un seuillage à $GL = 170$ a été effectué sur toutes les images. Avec cette valeur seuil, le pourcentage de pixels détectés ne dépasse jamais 10% des pixels de l'image et assure la détection des agrégats présents dans une épaisseur comprise entre 0 et 70 μm sous la surface¹.

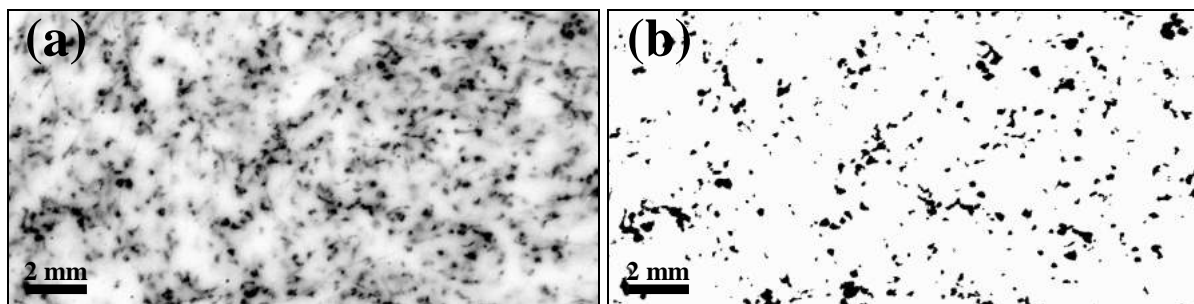


Fig. 4B.2. Image de la pâte Isengrain 1.34 F/W 90rpm prélevée à $0.5 t_{peak}$. (a) Image Red au format 8 bit et (b) Image Grey au format 8 bit seuillée pour $GL \leq 170$.

¹ Le gluten après extraction présente une teneur en eau d'environ 68%. La fraction volumique du gluten dans la pâte peut ainsi être estimée comme voisine de 15-20% (avec $\rho_{farine}=1.48$, $\rho_{gluten\ sec}=1.3$, et 85% des protéines totales sous la forme de gluten). Si l'on place une sphère opaque de gluten dans un VER (volume élémentaire représentatif) cubique translucide, son aire de projection sur une surface parallèle à l'un des plans du cube occupera 34% de la surface projetée du VER. Comme la suspension d'amidon diffracte la lumière ($GL=245$), elle atténue la profondeur de champ à laquelle l'agrégat de gluten pourra être détecté. Ainsi, un film de gluten ($GL=125-130$) recouvert par 300 μm d'une suspension d'amidon n'est plus perçu. Si une couche de 67 μm de suspension d'amidon recouvre une sphère de gluten ($GL=125-130$), sa calotte polaire est perçue comme ayant un GL de 170. En utilisant un seuil de 170, nous choisissons délibérément de ne prendre en compte que la fraction des agrégats les plus proches de la surface.

L'image présentée en Fig. 4B.2a est l'image Red de l'image couleur RGB. Ce type d'image offre un rendu très contrasté des agrégats de gluten coloré au Fast Green (de couleur verte). Ces images ne sont toutefois pas utilisées pour la quantification car un certain nombre de pixels y sont saturés ($GL = 0$). L'image obtenue après seuillage à $GL = 170$ de l'image Grey 8 bit, obtenue après conversion de l'image couleur originale et non saturée, est présentée en Fig. 4B.2b. A partir de cette image binaire, le nombre et l'aire occupée par les particules noires ont été déterminés. Pour éviter de comptabiliser les pixels noirs isolés dont l'origine peut être très variée et difficilement interprétable, nous avons choisi de ne considérer que les particules présentant un diamètre supérieur à $30 \mu\text{m}$ ($= 15 \text{ pixels}^2$). Dans notre cas, l'utilisation de l'option "Watershed" du logiciel, qui sert de fragmenter les particules jointives afin de les comptabiliser individuellement, ne s'est pas révélée intéressante en raison de la forme des agrégats de gluten. Nous n'avons donc pas utilisé cette option. L'aire moyenne de chacune des particules a été calculée en divisant la somme des aires des objets noirs de plus de $30 \mu\text{m}$ par le nombre de ces objets. Le diamètre moyen des protéines - particule, agrégat ou filament - (D_{mean}) a ensuite été calculé en considérant que ces objets étaient des sphères. La reproductibilité des différentes mesures effectuées sur les images a été évaluée à partir des prélèvements répétés sur la pâte Isengrain 1.34 F/W 90rpm. Elle est présentée dans les figures de ce chapitre sous la forme d'écart type.

II. Résultats et Discussion

II.1. Courbes de pétrissage et points de prélèvements

Les courbes de développement obtenues pour les sept conditions de pétrissage étudiées sont présentées dans la Fig. 4B.3. L'influence de l'hydratation a été testée sur la variété Isengrain (Fig. 4B.3a-d) pour laquelle les valeurs de t_{peak} obtenues à 90 rpm pour des ratios F/W de 1.38-1.34-1.31-1.26 sont, respectivement, égales à 39-50-79-125 min. Le pétrissage de la pâte Isengrain 1.38 F/W à 60 rpm a pour sa part, permis un développement optimal de la pâte après 130 min de pétrissage, tandis que 39 min étaient suffisantes à 90 rpm.

Les domaines d'hydratation et de vitesse étudiés sur Isengrain ont permis d'obtenir des développements de pâte bien contrastés. Concernant l'étude variétale, les pâtes Orvantis 1.09 F/W , Caphorn 1.19 F/W et Isengrain 1.31 F/W pétries à 90 rpm présentent le même couple de base minimal, voisin de 1.2 N.m (Fig. 4B.3c,f,g) et ces pâtes se sont développées respectivement après 15, 100 et 79 min de pétrissage. En accord avec les résultats obtenus dans les **Chapitres 2A** et **4A**, Orvantis reste bien la variété la plus rapide du lot étudié. Par contre, dans cette étude basée sur la récolte 2006, Caphorn est plus lente à se développer qu'Isengrain. Cette variation du classement relatif des variétés Isengrain et Caphorn coïncide avec la modification de leurs teneurs respectives en polymères de gluténine insolubles dans le SDS (Tableau 4B.1) et conforte les hypothèses soulevées dans le **Chapitre 3A**.

Le pétrin a été stoppé au cours du pétrissage pour procéder au prélèvement de la pâte dans ses différents états de développement. Les cinq phases caractéristiques du développement d'une pâte diluée, à savoir la 1^{ère} descente du couple, la phase de latence, la montée au pic, l'optimum de développement (t_{peak}) et le sur-pétrissage, ont déjà été décrites dans les **Chapitres 2A** et **4A**. Pour toutes les pâtes étudiées, les prélèvements 0.03 et 0.93 t_{peak} correspondent respectivement à la phase de 1^{ère} descente du couple et à la phase de montée au pic. Entre ces prélèvements, la pâte a été prélevée majoritairement dans la phase de latence selon l'état de développement de la pâte (Fig. 4B.3). Toutes les pâtes ont ensuite été prélevées à t_{peak} et en sur-pétrissage.

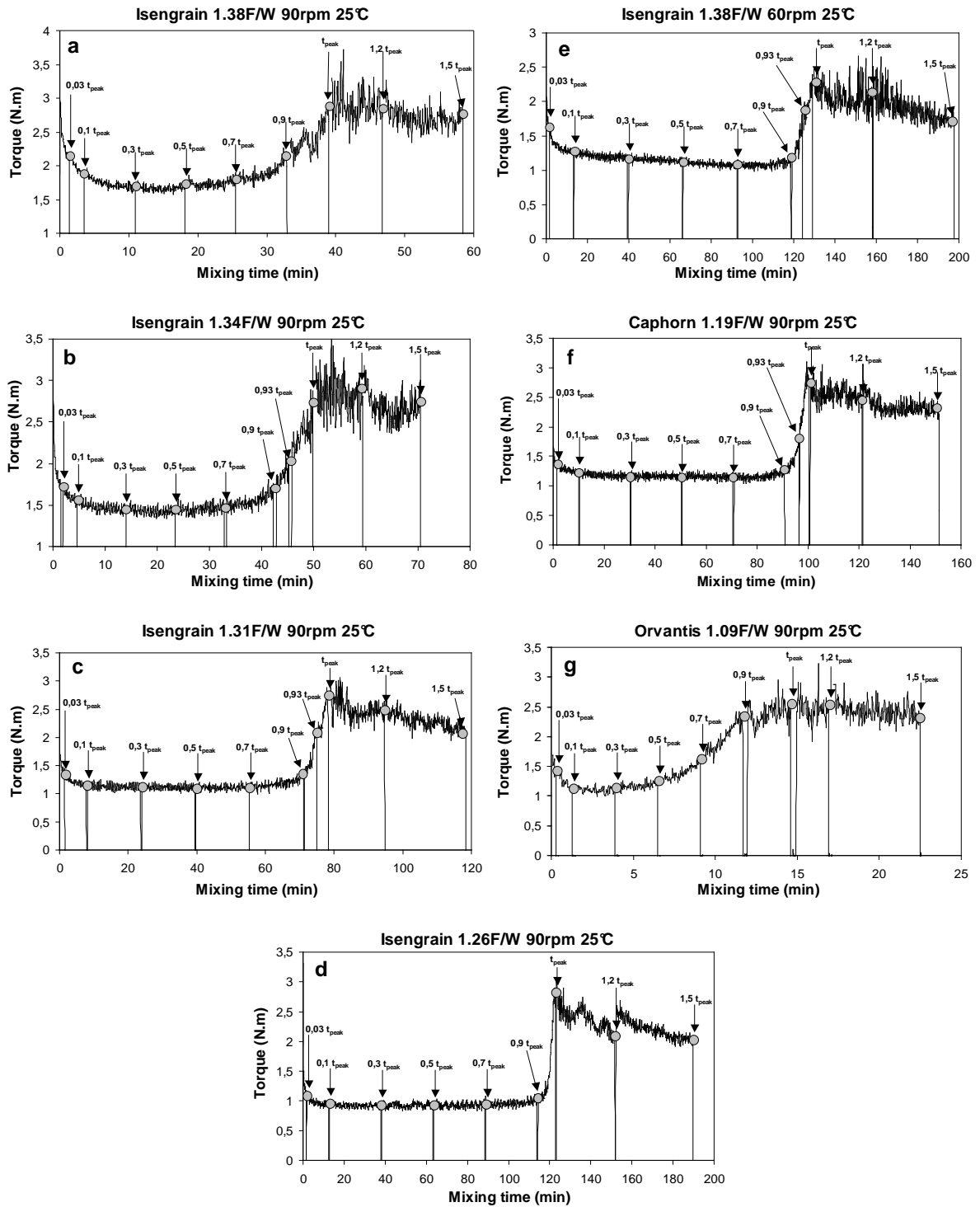


Fig. 4B.3. Courbes de pétrissage et points de prélèvements effectués sur les variétés Orvantis, Caphorn et Isengrain. (a-e) Influence de l'hydratation et de la vitesse de pétrissage sur la variété Isengrain. (f-g) Influence de la variété de farine utilisée. t_{peak} correspond au temps de développement optimal de la pâte.

II.2. Suivi de l'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage

Le suivi détaillé de l'agglomération des protéines est présenté de façon qualitative et quantitative sur la pâte Isengrain 1.34 F/W 90rpm prise pour exemple. Les images brutes obtenues au cours du pétrissage sont présentées dans la Fig. 4B.4.

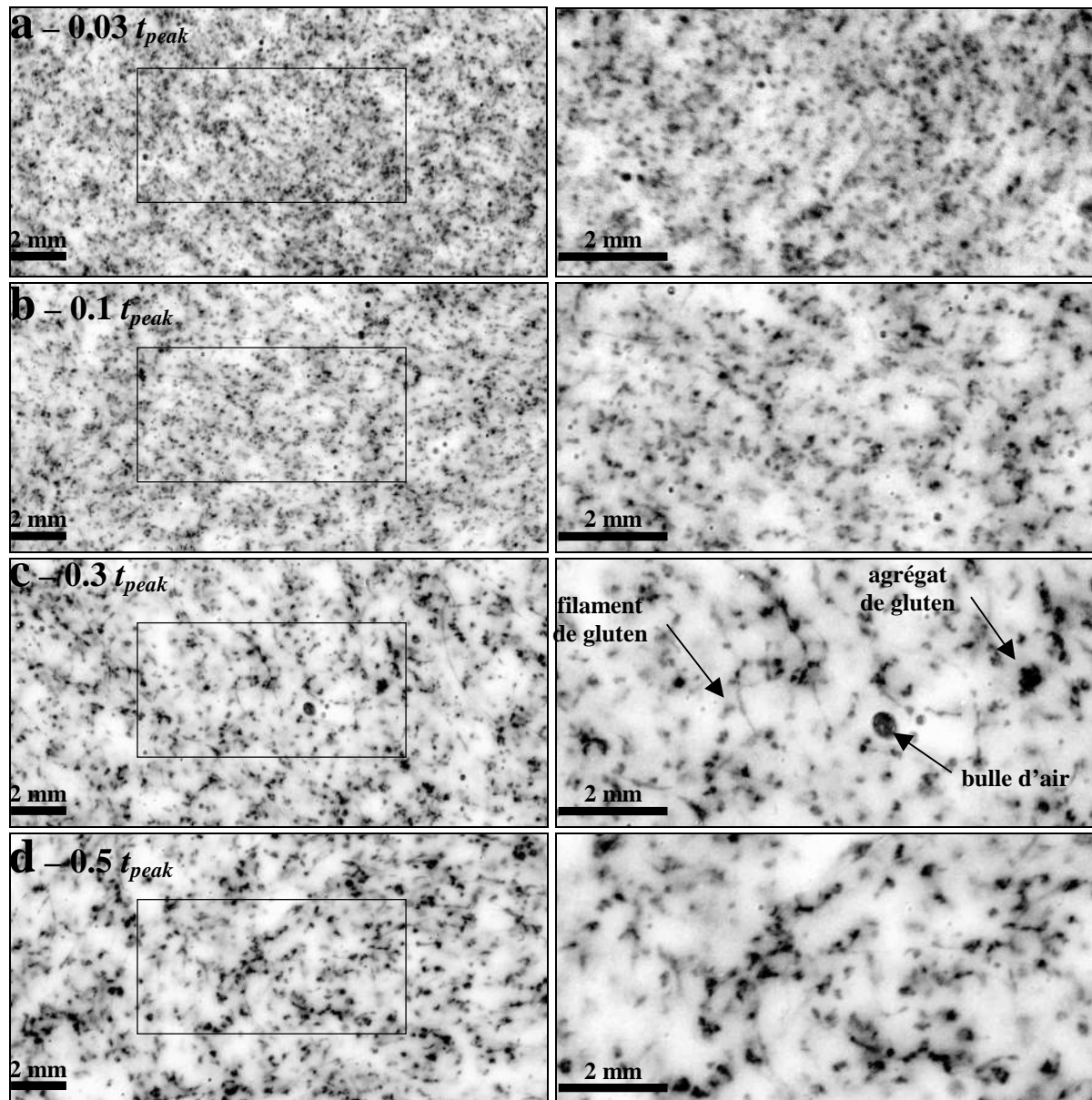


Fig. 4B.4. (a-j) Images brutes obtenues au cours du pétrissage de la pâte Isengrain 1.34 F/W à 90rpm. Voir Fig. 4B.3b pour la courbe de pétrissage. Taille des images RED: (gauche) 2.0 x 1.0 cm et (droite) 1.0 x 0.5 cm.

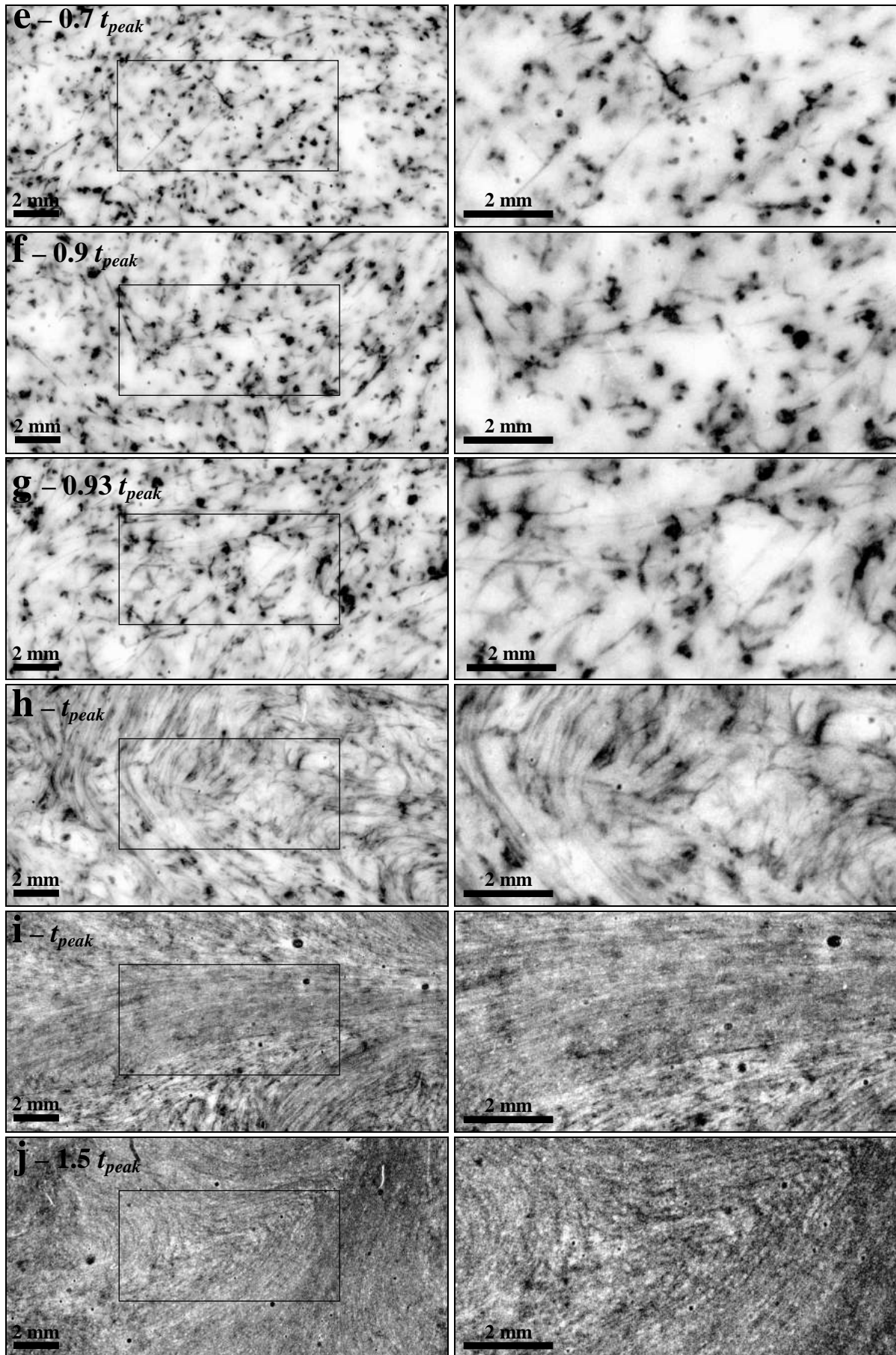


Fig. 4B.4. (Suite).

Au début du pétrissage ($0.03 t_{peak}$, Fig. 4B.4a), les agrégats protéiques, présents sous la forme de spots noirs intenses de petite taille, sont nombreux et répartis de façon homogène dans la pâte. Ils sont entourés d'un halo gris, les espaces uniformément clairs étant peu nombreux. Puis, au fur et à mesure que le pétrissage atteint la phase de latence ($0.1 t_{peak}$, Fig. 4B.4a-c), le nombre des agrégats diminue et leur taille augmente, tandis que des zones uniformément blanches apparaissent. Ce phénomène de croissance en taille des agrégats est assez rapide et semble plutôt spontané. Les halos diffus gris observés au début du pétrissage signalent peut-être la présence de particules protéiques de taille submicronique. Ces dernières pourraient venir s'agréger aux agrégats déjà constitués par le biais d'un mécanisme d'attraction colloïdale, mettant en jeu des forces de déplétion entre protéines et polysaccharides de la pâte, comme cela a déjà été observé dans d'autres systèmes protéine/polysaccharide (Imeson et al., 1977; Tolstoguzov, 1991; Piculell et Lindman, 1992; Langendorff et al., 1999). Par ailleurs la présence grandissante de zones "blanches", *i.e.* enrichies en amidon, pourrait être le signe qu'une ségrégation entre les agrégats protéiques d'une taille ($> 100 \mu\text{m}$) supérieure à celle des grains d'amidon ($2-25 \mu\text{m}$), ségrégation qui pourrait être induite par des forces hydrodynamiques. En accord avec les images présentées dans le **Chapitre 2A**, la phase de latence ($0.3 - 0.5 t_{peak}$) est caractérisée par la présence d'agrégats de gluten de plus grande taille, dont le diamètre moyen peut atteindre $300 \mu\text{m}$ (Fig. 4B.4c-d). Les agrégats commencent à produire des extensions filamenteuses dès $0.3 t_{peak}$ pour cette pâte. Cette filamentation, toutefois très sporadique au début de la phase de latence, s'intensifie et se généralise à tous les agrégats pendant la montée au pic (Fig. 4B.4f-g). A t_{peak} , les agrégats de gluten ont quasiment tous été convertis en filaments, à l'exception de quelques agrégats résiduels (Fig. 4B.4h). La structure de cette pâte à t_{peak} reste d'ailleurs relativement hétérogène et l'on distingue encore la présence de larges poches d'amidon. Les images suivantes (Fig. 4B.4i-j) révèlent qu'au cours du sur-pétrissage, les filaments de gluten s'organisent en faisceaux. L'orientation, le diamètre ainsi que l'espacement entre les filaments devient très régulier et cela sur une échelle qui avoisine celle de l'image (2 cm). Cette grande cohérence de comportement signale la percolation du réseau protéique. Alors que le pétrissage se poursuit, les filaments deviennent plus fins et plus proches les uns des autres, tout en restant alignés parallèlement aux lignes des champs de cisaillement. Ces images confirment les hypothèses proposées dans le **Chapitre 4A** et montrent que si les filaments de gluten se maintiennent en sur-pétrissage, ils subissent également un processus d'élongation les amenant à s'amincir et à se répartir de façon toujours plus homogène au sein de la pâte.

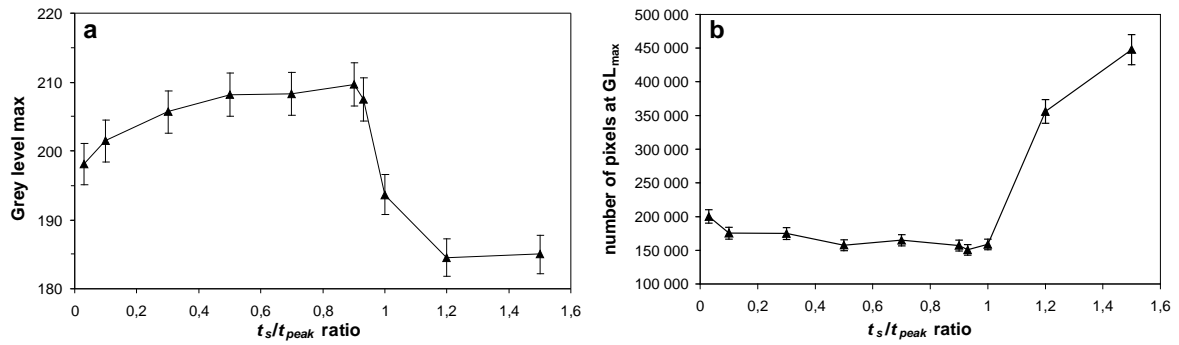


Fig. 4B.5. Evolution (a) de GL_{max} et (b) de $n_{GL_{max}}$ au cours du pétrissage de la pâte Isengrain 1.34 F/W à 90rpm. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3b pour la courbe de pétrissage.

Les évolutions des paramètres caractéristiques de l'histogramme des niveaux de gris, GL_{max} et $n_{GL_{max}}$, sont présentées au cours du pétrissage dans la Fig. 4B.5. L'augmentation progressive de GL_{max} observée entre 0.03 et 0.5 t_{peak} s'accompagne d'une diminution significative et progressive de $n_{GL_{max}}$. Outre le fait que l'image s'éclaircisse au cours du pétrissage (Fig. 4B.5a), ce résultat montre que l'image devient de plus en plus contrastée, en lien avec la formation de larges agrégats de gluten. Un phénomène d'agrégation des protéines du gluten dès le début du pétrissage a également été observé dans le cas de la pâte à pain (Paredes-Lopez et Bushuk, 1982; Moss et al., 1987; Calderon-Dominguez et al., 2003; Peighambardoust et al., 2006b). D'après la Fig. 4B.5 le blanchiment global de l'image, rapide au début du pétrissage (0-0.3 t_{peak}), ralentit ensuite au cours de la phase de latence.

La filamentation généralisée des agrégats de gluten qui s'opère à partir de 0.9 t_{peak} provoque la chute de GL_{max} mais n'affecte pas la valeur de $n_{GL_{max}}$ qui reste stable jusqu'à t_{peak} (Fig. 4B.5). Ceci confirme que l'image, qui s'assombrit sans que le contraste ne soit affecté, présente encore une composition hétérogène à une échelle largement supérieure à celle de la résolution (7 μm). L'homogénéité de la pâte ne survient finalement qu'en sur-pétrissage, comme le montre la chute de GL_{max} et l'augmentation brutale de $n_{GL_{max}}$. La pâte est alors homogène à l'échelle de la dizaine de microns (Fig. 4B.4j) et la valeur de GL_{max} tend vers 185. Dans les mêmes conditions de prise de vue, le gluten pur extrait de cette pâte présente un niveau de gris moyen de 130, alors qu'une suspension d'amidon pur présente quant à elle un niveau de gris de 245. La moyenne de ces deux niveaux de gris est égale à 187. Le fait que GL_{max} tende vers cette valeur en sur-pétrissage signifierait que la surface occupée par le gluten est identique à celle occupée par l'amidon. L'absence de contraste révèle pour sa part que le diamètre des filaments de gluten se rapproche de la résolution de l'image et donc de celui des grains d'amidon. Dans une telle pâte, et à l'échelle du dixième de micromètre, les grains

d'amidon pourraient apparaître comme des entités séparées par des fibrilles de gluten. C'est ce type de structuration qu'Amend et Belitz (1991) ont observé par MET sur une pâte à pain sur-pétrée.

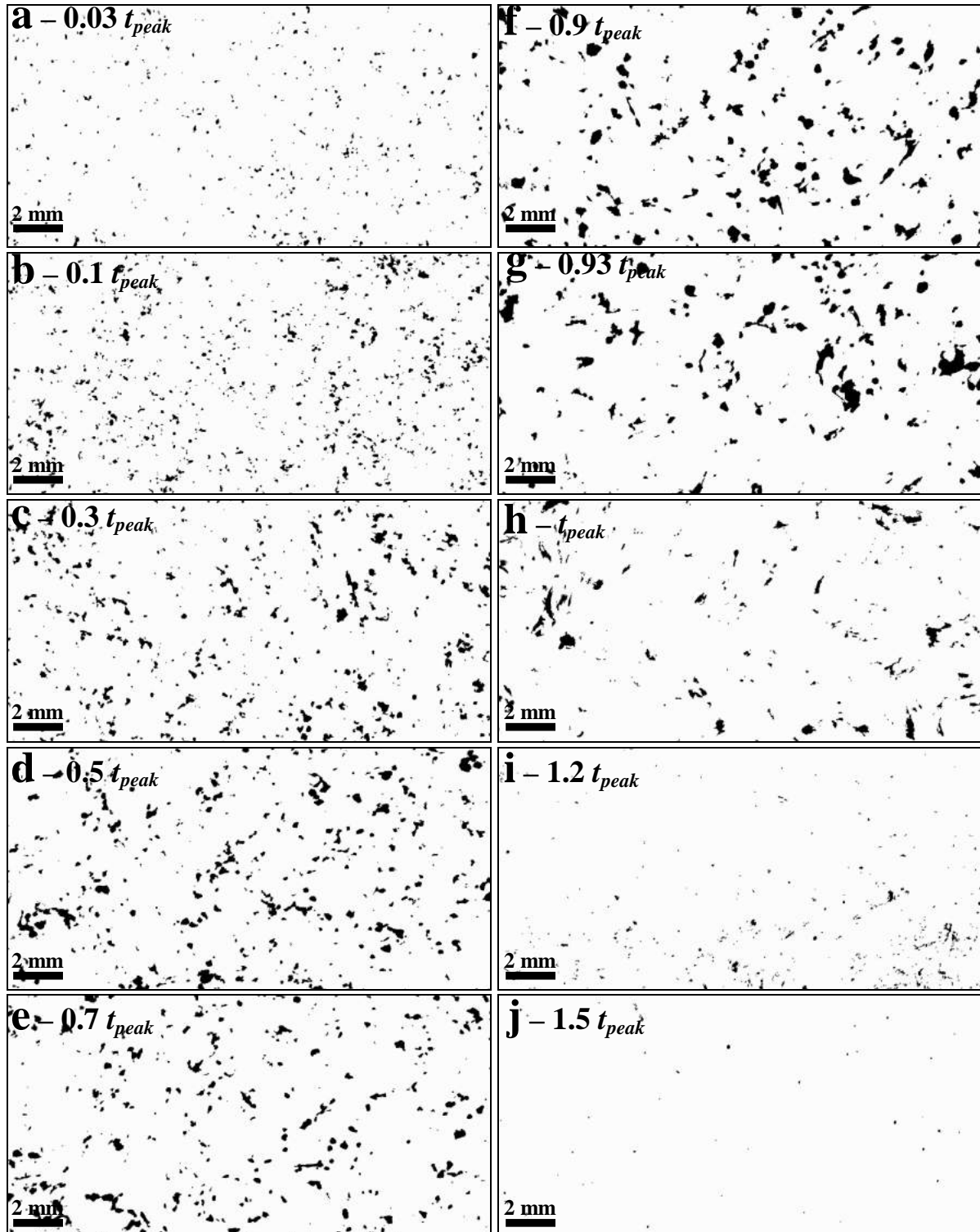


Fig. 4B.6. (a-j) Images seuillées à $GL = 170$ obtenues à partir des images brutes de la pâte Isengrain 1.34 F/W à 90rpm. Voir Fig. 4B.3b pour la courbe de pétrissage. Taille des images: 2.0 x 1.0 cm.

Les images brutes présentées dans la Fig. 4B.4 ont été seuillées de façon à isoler uniquement les pixels présentant un niveau de gris inférieur à 170. Les images seuillées, présentées dans la Fig. 4B.6, ont ensuite été analysées pour déterminer le nombre et la taille des particules. L'évolution de ces paramètres est présentée au cours du pétrissage dans la Fig. 4B.7.

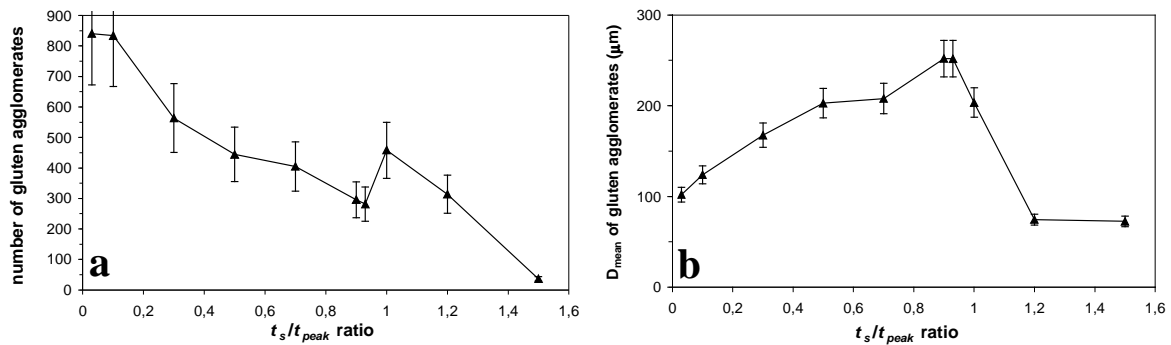


Fig. 4B.7. Evolution (a) du nombre d'agrégats de gluten et (b) du diamètre moyen de ces agrégats (D_{mean}) au cours du pétrissage de la pâte Isengrain 1.34 F/W à 90rpm. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3b pour la courbe de pétrissage. Données obtenues après seuillage des images brutes à $GL = 170$.

Au début du pétrissage, les analyses confirment que les agrégats protéiques sont petits ($\sim 100 \mu\text{m}$) et nombreux (Fig. 4B.7). Puis le diamètre des agrégats de gluten augmente de façon continue jusqu'à la phase de montée au pic, avec toutefois la présence d'un point d'inflexion ou d'un plateau à $0.5 t_{peak}$. Le diamètre moyen des agrégats atteint sa valeur maximale ($250 \mu\text{m}$) à $0.93 t_{peak}$. L'accroissement de taille s'accompagne logiquement d'une diminution simultanée du nombre des agrégats protéiques (Fig. 4B.7a). A t_{peak} , les filaments de gluten coexistent avec des résidus d'agrégats de taille encore conséquente ($D_{mean} \sim 200 \mu\text{m}$). En sur-pétrissage, le contraste de l'image diminue alors que tous les agrégats se transforment en filaments. En utilisant un seuil de coupure centré sur GL_{max} , (185, Fig. 4B.5a), il est possible d'estimer leur diamètre autour de $50\text{-}100 \mu\text{m}$ à partir de $1.2 t_{peak}$ ².

² Les valeurs de D_{mean} présentées dans cette étude doivent être considérées comme indicatives plutôt qu'absolues. Ces valeurs dépendent du niveau de gris choisi pour le seuillage. La valeur seuil de 170 permet assurément de repérer les agrégats de gluten (niveau de gris de 130) affleurant à la surface du prélèvement, mais ne garantit en aucun cas la détection des limites de leur périphérie, puisqu'ils sont plongés dans une suspension blanche de grains d'amidon. Ainsi, les valeurs présentées dans cette étude sont certainement inférieures à la réalité. De plus les valeurs de D_{mean} ne sont que des moyennes obtenues sur la totalité des particules recensées après seuillage. Comme le montre la Fig. 4B.6g, certaines conditions de pétrissage peuvent mener à une large distribution de taille des agrégats. Néanmoins, les variations de D_{mean} au cours du pétrissage étant bien supérieures à l'incertitude sur la répétabilité des mesures, l'analyse d'image semble être un outil pertinent pour suivre la cinétique d'agglomération *in situ* des protéines du gluten.

II.3. Influence du ratio farine/eau sur la cinétique d'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage

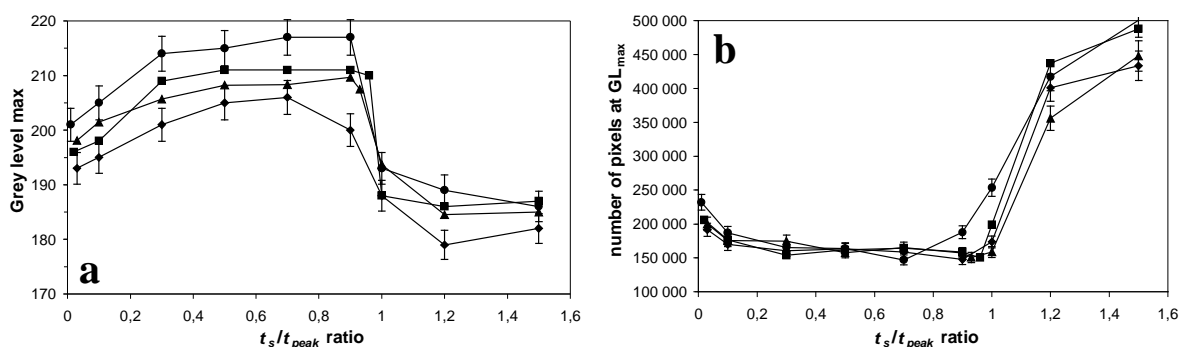


Fig. 4B.8. Evolution (a) de GL_{max} et (b) de $n_{GL_{max}}$ au cours du pétrissage des pâtes Isengrain pétries à 90 rpm pour quatre ratios farine/eau différents: (◆) 1.38, (▲) 1.34, (■) 1.31 et (●) 1.26. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3a-d pour les courbes de pétrissage.

L'évolution des paramètres GL_{max} et $n_{GL_{max}}$ est présentée pour les quatre pâtes Isengrain pétries à différentes hydratations dans la Fig. 4B.8. De façon générale, l'évolution de ces paramètres est identique pour toutes les hydratations testées. Cela montre que la séquence d'évènements décrite dans la *partie II.2* est valable pour toutes les pâtes diluées. Néanmoins, certaines différences quantitatives apparaissent entre les quatre pâtes étudiées.

Il est possible d'estimer l'impact de la dilution sur le niveau de gris moyen, en prenant en compte les variations de la fraction volumique de la farine selon l'hydratation des pâtes. La Fig. 4B.9 présente l'évolution des valeurs de GL_{max} après leur normalisation sur la base d'une pâte à 1.26 F/W.

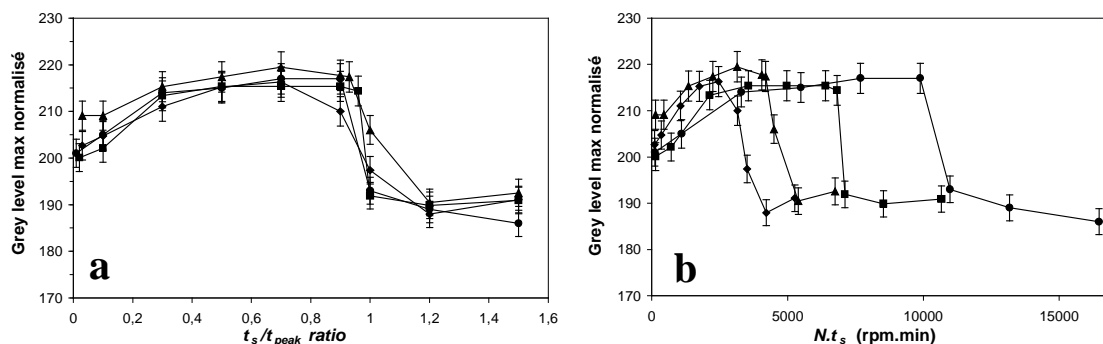


Fig. 4B.9. Evolution des GL_{max} normalisés pour des pâtes Isengrain pétries à 90 rpm pour quatre ratios farine/eau différents: (◆) 1.38, (▲) 1.34, (■) 1.31 et (●) 1.26. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. La phase volumique de farine dans la pâte est calculée en considérant une densité de 1.48 pour la farine (base humide). La valeur calculée pour la pâte à F/W 1.26 est prise comme base d'ajustement des valeurs de GL_{max} .

Il apparaît clairement qu'une seule et même séquence d'événements concerne toutes les pâtes, indépendamment de leur hydratation (Fig. 4B.9a). La présentation de GL_{max} normalisé en fonction du cumul de déformation $N.t_s$ (produit du temps par la vitesse de pétrissage) permet de révéler les différentes cinétiques de croissance des agrégats selon les pâtes. Le blanchiment de l'image est plus important au début du pétrissage dans le cas des pâtes les plus consistantes ($F/W = 1.38$ et 1.34), signalant une croissance rapide de la taille des agrégats au sein de ces pâtes. Ceci pourrait être dû à la plus forte probabilité de contacts des agrégats dans les pâtes les plus concentrées.

Pour la pâte la plus consistante ($F/W = 1.38$), GL_{max} diminue avant l'arrivée à t_{peak} , conformément à une filamentation précoce révélée à l'examen de la courbe de couple. A t_{peak} , les valeurs de GL_{max} chutent pour les quatre pâtes en raison de la filamentation du gluten mais il est intéressant de noter que les valeurs de $n_{GL_{max}}$ sont significativement plus élevées pour les pâtes très diluées que pour les pâtes plus concentrées (Fig. 4B.8b). Cela suggère qu'à t_{peak} , les pâtes diluées sont moins contrastées que les pâtes concentrées. On peut en déduire que la distribution des grains d'amidon et des filaments protéiques est plus homogène dans le cas des pâtes diluées à t_{peak} , et par conséquent que le diamètre des filaments serait plus faible.

La Fig. 4B.10 révèle que la taille maximale des agrégats varie peu selon les conditions d'hydratation de la pâte³. Il semble que la filamentation des agrégats protéiques intervienne toujours aux environs d'un diamètre seuil compris entre 217 et 219 μm , et cela indépendamment de la teneur en eau des pâtes. Par ailleurs, la croissance en taille des agrégats apparaît plus rapide dans le cas des pâtes concentrées. Elle présente un caractère bi-phasique marqué, qui correspond à une inflexion autour de $0.3-0.5 t_{peak}$. Par opposition, la croissance en taille des agrégats est continue dans le cas de la pâte la plus diluée ($F/W = 1.26$, Fig. 4B.10). Comme suggéré précédemment, différents mécanismes pourraient contribuer à la croissance en taille des agrégats (déplétion et ségrégation). Dans le cas de la pâte la plus diluée, un seul d'entre eux serait à l'œuvre. Ce type de pâte mettrait ainsi plus longtemps à se développer. A t_{peak} , le diamètre moyen des filaments de gluten diffère selon le ratio F/W utilisé: les filaments de gluten sont significativement plus fins au sein des pâtes les plus diluées qu'au sein des pâtes les plus concentrées. Ce résultat concorde avec les variations de la valeur de $n_{GL_{max}}$

³ Ce résultat est conditionné par le choix d'un seul et même seuil de détection des agrégats à un niveau de gris de 170. De fait la variation du ratio F/W de 1.26 à 1.38 pourrait favoriser la flottaison des agrégats de gluten (de plus ou moins 1% d'après nos estimations). A l'opposé, une phase amylicée plus concentrée pourrait contribuer à circonscrire encore le diamètre détectable des agrégats. Nous avons contrôlé l'effet écran de grains d'amidon (83 à 120 %, p/p) en suspension dans une solution aqueuse de CMC à 1%. Des résultats similaires ont été obtenu indépendamment de la concentration en amidon. Le choix d'un même seuil de 170 pour toute les pâtes nous semble ainsi justifié.

(Fig. 4B.8b) et conforte l'hypothèse que nous avons formulée dans le **Chapitre 4A**, selon laquelle les filaments d'une pâte à pain à t_{peak} seraient plus larges que ceux d'une pâte diluée.

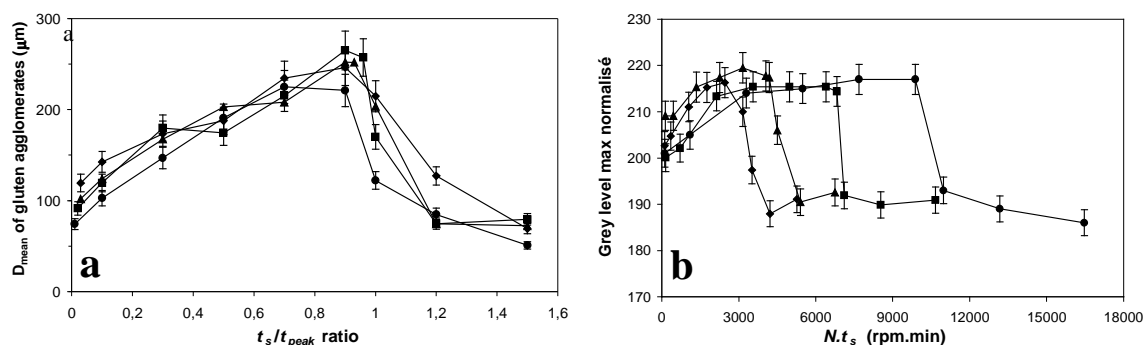


Fig. 4B.10. Evolution du diamètre moyen des agglomérats de gluten (D_{mean}) au cours du pétrissage des pâtes Isengrain pétries à 90 rpm pour quatre ratios farine/eau différents: (◆) 1.38, (▲) 1.34, (■) 1.31 et (●) 1.26. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3a-d pour les courbes de pétrissage.

En sur-pétrissage, le diamètre des filaments de gluten continue de diminuer, plus rapidement pour les pâtes concentrées que pour la pâte la plus diluée (Fig. 4B.10). Ce résultat suggère que les filaments de gluten présents au sein d'une pâte concentrée subissent une déformation plus importante que ceux d'une pâte diluée. Toutefois, si le sur-pétrissage est maintenu suffisamment longtemps ($1.5 t_{peak}$), toutes les pâtes présentent alors des filaments de gluten très fins ($D_{mean} \sim 70 \mu m$) répartis de façon très homogène au sein de la pâte.

II.4. Influence de la vitesse de pétrissage sur la cinétique d'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage

L'évolution des paramètres GL_{max} et $n_{GL_{max}}$ est présentée pour les deux vitesses de pétrissage testées dans la Fig. 4B.11. A $0.03 t_{peak}$, les deux pâtes présentent les mêmes valeurs de GL_{max} , en accord avec le fait qu'elles ont été obtenues avec le même ratio F/W . Par contre, les valeurs divergent significativement au-delà de $0.03 t_{peak}$. La vitesse de pétrissage, contrairement à l'hydratation de la pâte, modifie la cinétique de formation des agrégats. La présentation de GL_{max} en fonction de la déformation cumulée révèle une même croissance initiale de GL_{max} (Fig. 4B.11b). Les deux pâtes ne diffèrent alors que par la déformation cumulée conduisant à la filamentation. Ce résultat suggère que l'augmentation de la vitesse de pétrissage accélère la conversion agrégats/filaments.

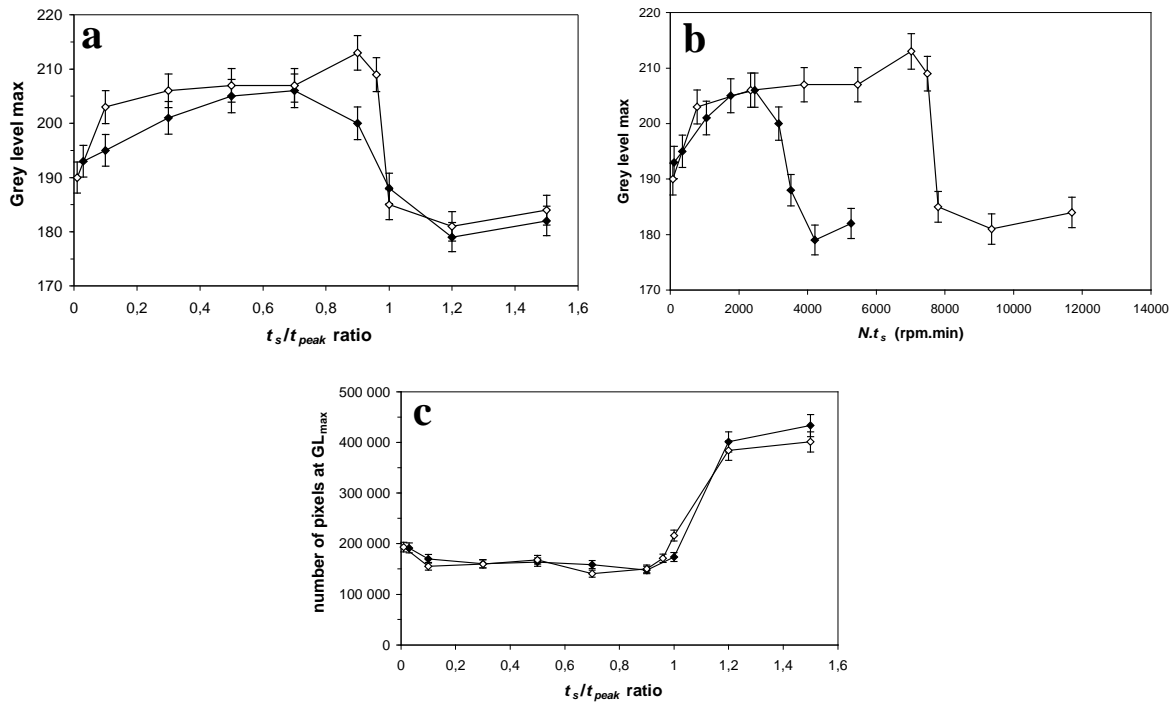


Fig. 4B.11. Evolution (a-b) de GL_{max} et (c) de $n_{GL_{max}}$ au cours du pétrissage des pâtes Isengrain pétries à un ratio farine/eau de 1.38 mais à deux vitesses différentes: (◆) 90 rpm et (◇) 60 rpm.

À t_{peak} , on observe que le contraste de l'image ($n_{GL_{max}}$) est plus faible pour la pâte pétrie à 60 rpm, qui a nécessité 130 min de pétrissage, que pour celle pétrie à 90 rpm, qui n'a nécessité que 39 min de pétrissage (Fig. 4B.11). Ce résultat est semblable à celui observé précédemment dans le cas des pâtes les plus diluées. Ainsi, la pâte pétrie à faible vitesse - de ce fait lente à se développer - présente une structure filamenteuse plus homogène à t_{peak} . Ceci est à relier au mécanisme de développement de la pâte proposé dans le **Chapitre 4A**.

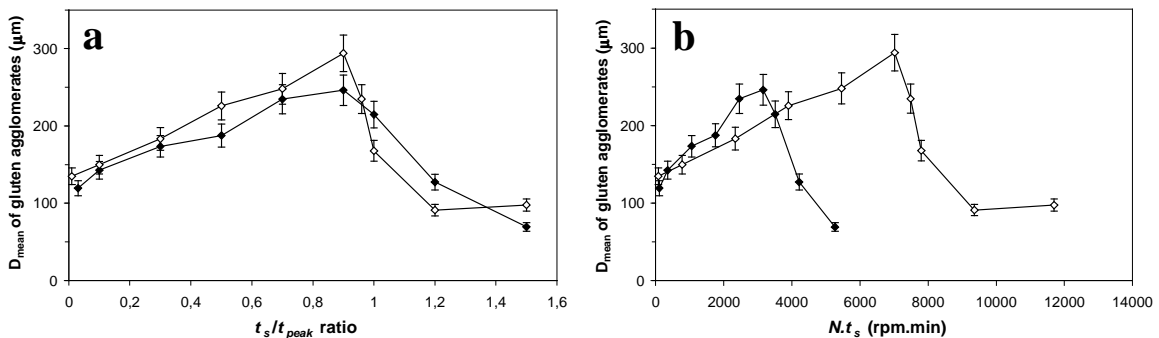


Fig. 4B.12. Evolution du diamètre moyen des agglomérats de gluten (D_{mean}) au cours du pétrissage des pâtes Isengrain pétries à un ratio farine/eau de 1.38 à deux vitesses différentes: (◆) 90 rpm et (◇) 60 rpm. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3a,e pour les courbes de pétrissage.

La Fig. 4B.12a révèle que les cinétiques de croissance en taille des agrégats protéiques sont globalement similaires à 60 et 90 rpm, et cela jusqu'à t_{peak} . Les agrégats semblent cependant plus volumineux à 60 rpm. La présentation de ces mêmes résultats en fonction de la déformation cumulée est plus instructive (Fig. 4B.12b). A 90 rpm, la croissance en taille des agrégats y apparaît plus rapide et la conversion en filaments se produit pour une taille significativement plus faible qu'à 60 rpm. La fréquence des collisions entre les agrégats, tout comme l'efficacité des chocs, peut être considérée comme une fonction croissante de la vitesse de pétrissage. La fréquence des collisions est implicitement prise en compte dans la représentation de D_{mean} en fonction du nombre de révolutions. La différence entre les cinétiques de croissance indiquerait donc qu'à 90 rpm, la fusion des agrégats est favorisée suite à leurs collisions.

La croissance monotone de la taille des agrégats est interrompue par leur conversion en filaments. Cet événement correspond à la déformation des agrégats sous l'effet du cisaillement. Il est donc logique qu'il intervienne d'autant plus précocement que la vitesse est élevée. D'autre part, nous avons montré que l'évolution physico-chimique des gluténines au cours du pétrissage va dans le sens d'une diminution de l'élasticité du gluten, favorisant ainsi sa déformation sous cisaillement. Dans la mesure où un couple supérieur est obtenu à 90 rpm, une évolution accélérée de la maturation des gluténines est également attendue, maturation qui favoriserait également une initiation plus précoce de la filamentation des agrégats. Enfin, la taille des agrégats est inversement reliée à leur densité en nombre. La distance entre les agrégats est faible lorsque leur taille est petite. En conséquence, le taux de déformation permettant d'assurer la jonction entre deux agrégats est également plus faible. La filamentation n'est donc pas simplement déclenchée par l'atteinte d'une taille critique de l'ensemble des agrégats, mais relève également d'un déterminisme multi-factoriel.

II.5. Influence de la variété de farine sur la cinétique d'agglomération in situ des protéines du gluten au cours du pétrissage

Les trois variétés de farine ont été étudiées dans les mêmes conditions de viscosité de base précédant la montée au pic et dans les mêmes conditions de vitesse de pétrissage. Dans ces conditions de pétrissage, Orvantis et Isengrain présentent une évolution très proche des paramètres GL_{max} et $n_{GL_{max}}$ durant tout le pétrissage. Orvantis se démarque toutefois entre 0.5 et t_{peak} en raison de sa filamentation très précoce (Fig. 4B.3g).

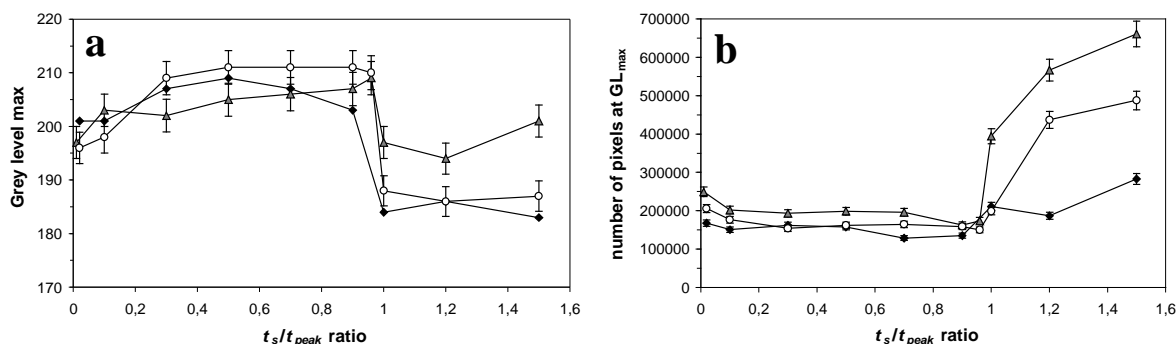


Fig. 4B.13. Evolution (a) de GL_{max} et (b) de $n_{GL_{max}}$ au cours du pétrissage des pâtes (◆) Orvantis 1.09 F/W 90 rpm, (▲) Caphorn 1.19 F/W 90rpm et (○) Isengrain 1.31 F/W 90 rpm. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3c,f,g pour les courbes de pétrissage.

Caphorn se démarque des deux autres variétés tout au long du pétrissage. En sous-pétrissage, elle présente des valeurs de GL_{max} plus faibles et des valeurs de $n_{GL_{max}}$ plus élevées, signifiant que ses images sont toujours moins contrastées que les images obtenues sur les deux autres variétés (Fig. 4B.13). Cette différence est encore plus marquée à t_{peak} (Fig. 4B.13b) et les images brutes montrent clairement que les filaments de gluten sont beaucoup plus fins et homogènes dans le cas de la pâte Caphorn (Fig. 4B.14c) que dans le cas des pâtes Orvantis et Isengrain (Fig. 4B.14a-b), en accord avec leur temps de développement (Fig. 4B.3).

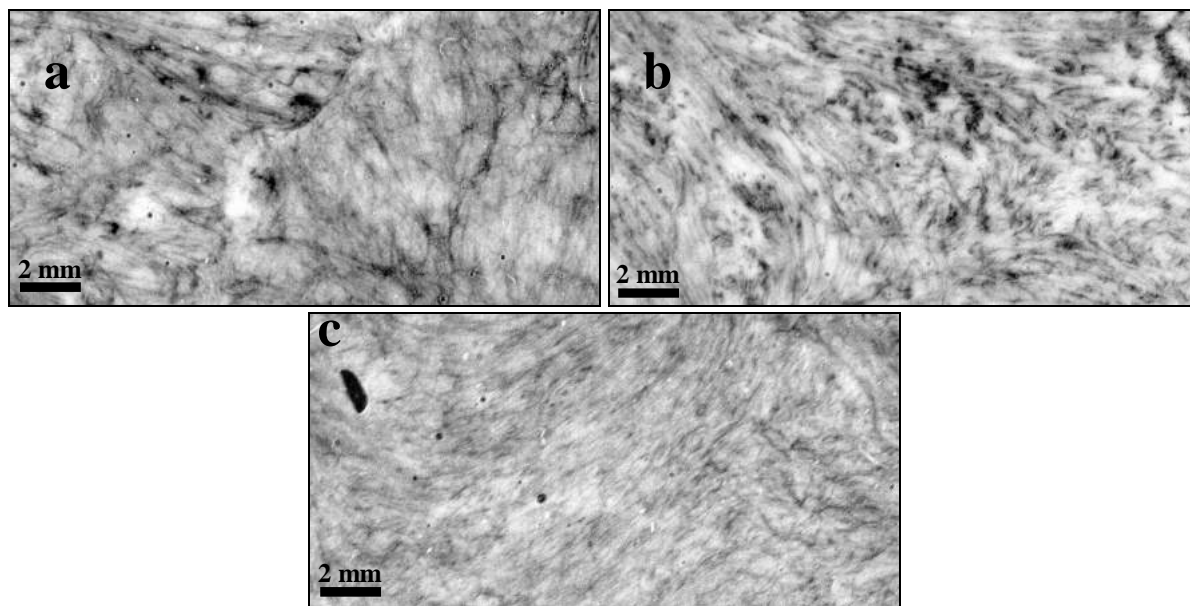


Fig. 4B.14. Images brutes obtenues à t_{peak} pour les pâtes (a) Orvantis 1.09 F/W 90 rpm, (b) Isengrain 1.31 F/W 90 rpm et (c) Caphorn 1.19 F/W 90rpm. Voir Fig. 4B. 3c,f,g pour les courbes de pétrissage. Taille des images: 2.0 x 1.0 cm.

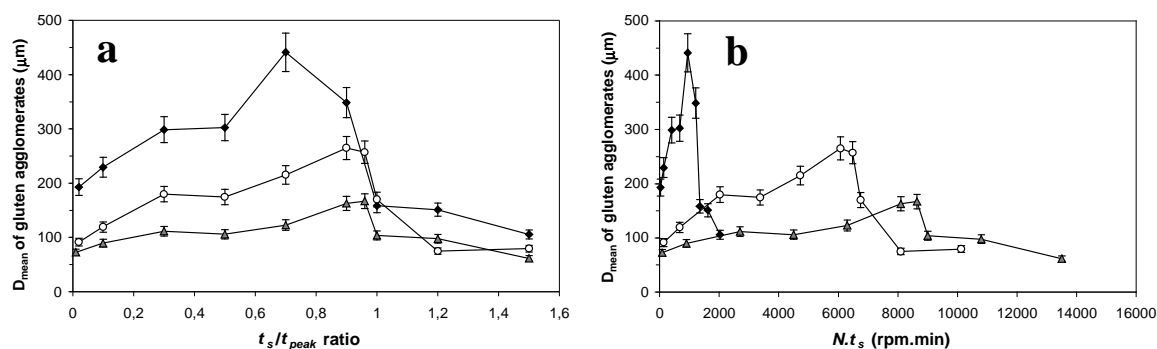
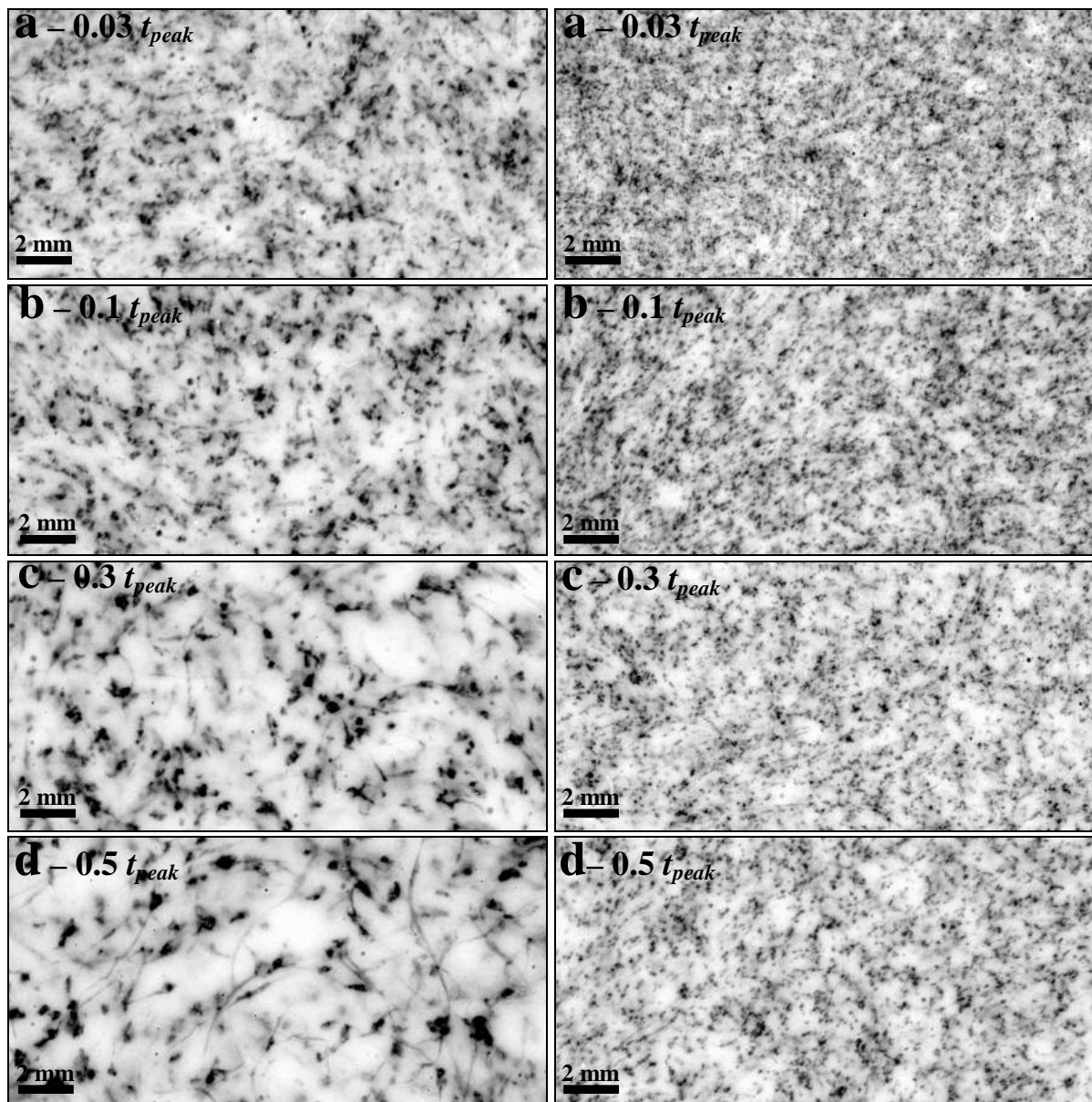


Fig. 4B.15. Evolution du diamètre moyen des agglomérats de gluten (D_{mean}) au cours du pétrissage des pâtes (\blacklozenge) Orvantis 1.09 F/W 90 rpm, (\blacktriangle) Caphorn 1.19 F/W 90rpm et (\circ) Isengrain 1.31 F/W 90 rpm. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3c,f,g pour les courbes de pétrissage.

L'évolution de taille des agrégats protéiques au cours du pétrissage est présentée pour les trois farines dans la Fig. 4B.15. La variété de farine se révèle être un facteur critique conditionnant la taille des agrégats et ce bien avant les effets de la vitesse ou de l'hydratation des pâtes. Durant toute la durée du sous-pétrissage, Orvantis présente les plus gros agrégats de gluten, dont le diamètre moyen D_{mean} évolue de 200 μm à 450 μm . De plus, cette variété présente la cinétique de croissance des agrégats la plus forte. Dans le **Chapitre 4A**, nous avons observé que les glutens extraits des pâtes Orvantis étaient récupérés sur le tamis le plus large dès 0.1 t_{peak} . Les résultats obtenus *in situ* dans la pâte confirment que la capacité d'agglomération des protéines de la variété Orvantis est très élevée. Nous avons

précédemment supposé (**Chapitre 4A**) que la capacité d'agglomération des agrégats de gluten pourrait être reliée à leur teneur en polymères de gluténine insolubles dans le SDS (*Fi*). Les valeurs de *Fi* rapportées dans le Tableau 4B.1 pour les trois farines, ainsi que le classement en taille de leurs agrégats, s'accordent avec cette hypothèse. Cependant, pour affirmer définitivement que l'efficacité des collisions entre les agrégats dépend bien du taux de dépolymérisation des gluténines, il faudrait étudier en parallèle la cinétique de dépolymérisation des *Fi* pour les pâtes étudiées dans ce chapitre.

Les images obtenues sur les variétés Orvantis et Caphorn sont présentées dans la Fig. 4B.16.



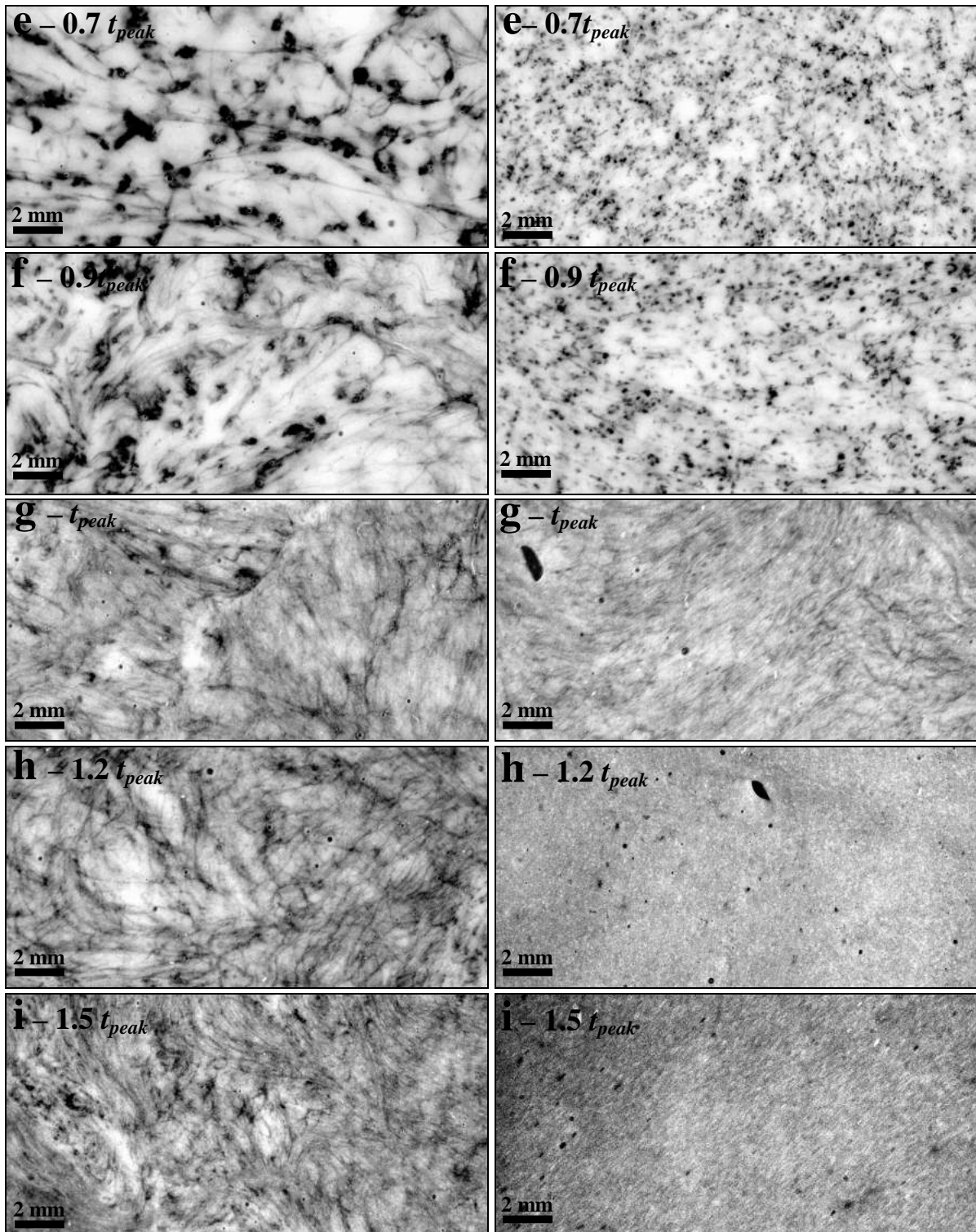


Fig. 4B.16 Images obtenues au cours du pétrissage des pâtes (gauche) Orvantis 1.09 F/W 90 rpm et (droite) Caphorn 1.19 F/W 90rpm. Voir Fig. 4B.3f,g pour les courbes de pétrissage. Taille des images: 2.0 x 1.0 cm.

Les images obtenues sur Caphorn manquent de contraste (n_{GLmax} élevé) et sont plus sombres (GL_{max} faible) car elles sont composées de petits agrégats de gluten très régulièrement distribués dans la pâte. De fins filaments de gluten apparaissent très localement dès $0.3 t_{peak}$

pour la pâte Caphorn (Fig. 4B.17). Cette fréquence d'apparition est faible et, contrairement à Orvantis, ne semble pas vraiment augmenter au cours de la phase de latence. Cependant, les zones blanches, qui sont relatives aux poches d'amidon ségréguées des agrégats de gluten, tendent à s'étaler de façon progressive mais significative. Ceci prouve que les agrégats de gluten commencent à interagir et à adopter un comportement collectif, bien que restant en apparence individualisés. Nous supposons que des jonctions s'établissent entre les agrégats du fait de la présence de courts liens filamenteux (Fig. 4B-17). A $0.9 t_{peak}$, la maturité physico-chimique - dépolymérisation des *Fi* - semble atteinte et tous les agrégats produisent de courts filaments qui assurent leur jonction (Fig. 4B.3f).

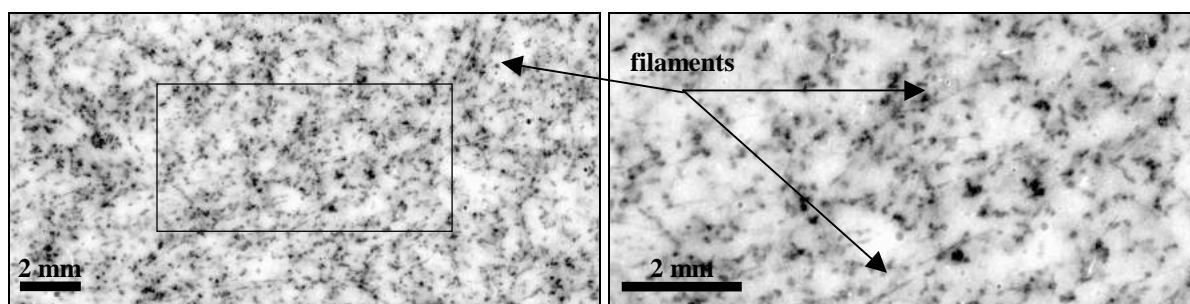


Fig. 4B.17. Images brutes obtenues à $0.3 t_{peak}$ pour la pâte Caphorn 1.19 F/W 90rpm. Voir Fig. 4B.3f pour la courbe de pétrissage. Taille des images: (gauche) 2.0 x 1.0 cm et (droite) 1.0 x 0.5 cm.

Le défaut de capacité d'agglomération des agrégats de la pâte Caphorn continue de ce manifester au cours du sur-pétrissage. Ainsi, le diamètre moyen des filaments d'Orvantis à $1.5 t_{peak}$ reste bien supérieur à celui obtenu pour les filaments des pâtes Caphorn et Isengrain (Fig. 4B.15). La situation est évidente sur la Fig. 4B.16i, qui montre qu'un réseau filamenteux est encore très hétérogène pour Orvantis, tandis qu'il est complètement homogène pour la pâte sur-pétrie Caphorn.

III. Conclusion

Cette étude montre que le pétrissage provoque un bouleversement de la structure et de l'organisation des protéines au sein de la pâte. Au début du pétrissage, le mélange farine-eau se compose d'une suspension homogène d'agrégats protéiques de petite taille (50-100 μm) en mélange avec les grains d'amidon (2-30 μm). L'hydratation et l'action de mélange du pétrissage provoquent la croissance en taille de ces agrégats, vraisemblablement selon un mécanisme de collision-fusion ou collision-adsorption. Toutefois, le caractère souvent bi-

modale de la croissance en taille des agrégats au cours du pétrissage suggère que différents mécanismes pourraient être en jeu. Ainsi, le contraste entre la phase gluten et la phase amidon, qui atteint son optimum en fin de période de latence, suggère l'existence d'effets hydrodynamiques favorisant la ségrégation entre les grains d'amidon et les agrégats de gluten. De même, le "blanchiment" de la pâte observé au tout début du pétrissage, permet d'envisager l'existence de particules de gluten de taille submicronique qui seraient alors soumises à des forces d'attractions et de déplétion colloïdales.

La filamentation des agrégats de gluten est manifeste de façon discrète tout au long du pétrissage. Elle devient collective au voisinage de t_{peak} , tout en étant déconnectée de la taille des agrégats de gluten. Conformément à nos précédentes hypothèses (**Chapitre 4A**), cette filamentation relèverait de la modification physico-chimique des polymères de gluténine au cours du pétrissage. Suivant la densité en nombre des agrégats dans la pâte, une filamentation plus ou moins importante et généralisée serait nécessaire pour assurer la percolation des filaments protéiques qui conduit au développement du réseau de gluten. A t_{peak} , la pâte est alors constituée de fins filaments de gluten (30–70 μm), dont le diamètre se rapproche de celui des grains d'amidon.

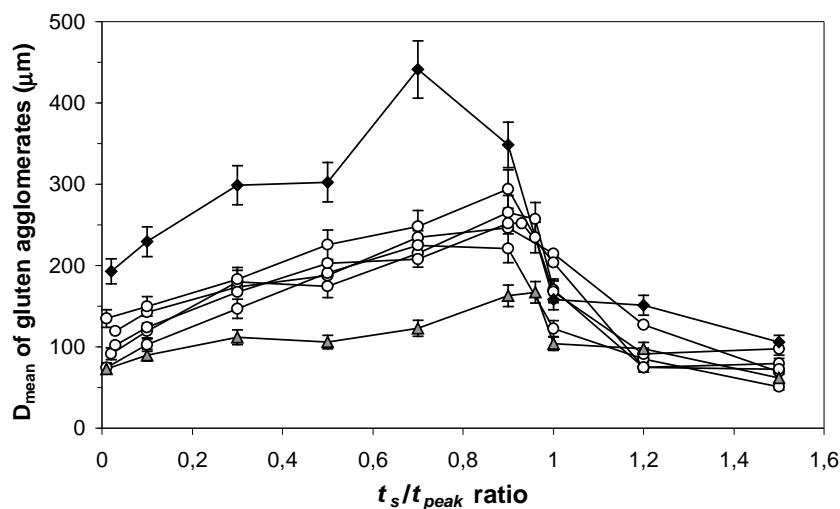


Fig. 4B.18. Evolution du diamètre moyen des agglomérats de gluten (D_{mean}) au cours du pétrissage des pâtes (◆) Orvantis, (▲) Caphorn et (○) Isengrain. t_s correspond au temps de prélèvement et t_{peak} au temps de développement optimal de la pâte. Voir Fig. 4B.3 pour les courbes de pétrissage.

Comme l'atteste la Fig. 4B.18 qui reprend les différents résultats présentés et discutés auparavant, cette étude montre que les conditions opératoires (hydratation et vitesse de pétrissage) n'affectent que très peu la cinétique de croissance des agrégats de gluten. C'est la

farine qui est à l'origine des comportements les plus contrastés. La teneur en gluténines insolubles dans le SDS de la farine pourrait d'ailleurs être un facteur indicatif de la capacité d'agglomération du gluten. L'analyse de la variété Caphorn suggère ainsi que les agrégats de gluten peuvent interagir, sans fusionner pour autant, grâce à des pontages établis par des filaments. Cette étude confirme que le développement rapide des pâtes Orvantis est lié à la très forte capacité d'interaction de ses protéines, qui se traduit par la formation d'agrégats de gluten de très grande taille en sous-pétrissage et par une filamentation très persistante en sur-pétrissage. En parallèle au **Chapitre 4A**, il semble que la teneur de la farine et de la pâte en polymères de gluténine insolubles dans le SDS soit le critère déterminant de la cinétique de prise de pâte. D'autres facteurs variétaux pourraient toutefois être déterminants pour la taille des agrégats. Des études complémentaires devront être menées pour éclaircir ce point.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE

I. Objectifs

Dans sa forme la plus simple, le pétrissage est une opération unitaire qui consiste à mélanger énergiquement de la farine de blé et de l'eau. Cette opération ancestrale provoque la formation du réseau visco-élastique de gluten au sein de la pâte (Bechtel et al., 1978; Parades-Lopez et Bushuk, 1983b; Bloksma, 1990). La présence de ce réseau est une condition fondamentale à la panification de la pâte car il est responsable de la formation de la mie et permet d'obtenir des pains aérés. Dans le cas de la pâte à pain, la formation de ce réseau est très rapide et s'obtient facilement. Toutefois, les mécanismes précis impliqués dans sa formation ne sont toujours pas connus, ni de la communauté scientifique, ni des boulangers et pas du grand public. Pourtant la connaissance de tels mécanismes ouvrirait la voie à de nombreuses applications industrielles. En premier lieu, elle permettrait de maîtriser et par conséquent de standardiser le degré de formation du gluten dans la pâte selon les conditions opératoires. La standardisation du produit fini (pain, biscuit, ...) est de nos jours une attente de plus en plus forte de la part des consommateurs. Cette connaissance permettrait également de maîtriser la cinétique de formation du gluten et, par conséquent, de l'accélérer ou de la ralentir selon les besoins. Des gains de temps et/ou d'énergie pourraient ainsi être envisagés. Les boulangers ne seraient pas les seuls bénéficiaires d'une telle connaissance; les amidonniers qui travaillent le blé le seraient également. Comprendre comment les protéines du gluten s'agglomèrent faciliterait leur séparation de l'amidon. Enfin, pour ne citer qu'un dernier exemple, cette connaissance pourrait également permettre de trouver les moyens techniques de développer le réseau de gluten dans des conditions qui n'ont encore jamais été testées ou au contraire de ne pas le développer, menant pourquoi pas à la création de nouveaux produits et de nouvelles textures à partir de la farine de blé.

La méconnaissance actuelle des mécanismes de formation du gluten ne résulte pourtant pas d'un manque d'intérêt de la communauté scientifique. Au contraire, depuis plus d'un siècle, le pétrissage de la pâte à pain fait l'objet de très nombreuses recherches. On sait notamment que le gluten ne peut se former que si les protéines de la farine de blé sont suffisamment hydratées (Tipples et Kilborn, 1975) et si elles sont mélangées de façon énergique (Tipples et Kilborn, 1975; Gaines et al., 1988), événements concomitants dans la préparation de la pâte à pain. Les conditions d'hydratation, la vitesse et la température de pétrissage, la quantité d'énergie et la nature de la déformation apportée par le système de

pétrissage sont autant de facteurs paramétriques qui influencent le développement du réseau de gluten (Markley et Bailey, 1939; Hlynka, 1962; Kilborn et Tipples, 1972; Frazier et al., 1975; Baig et Hosney, 1977; Wilson et al., 1997; Peighambardoust et al., 2007), sans toutefois que l'on connaisse précisément les lois d'action. D'un point de vue biochimique, alors que le pétrissage provoque la structuration du réseau de gluten à l'échelle macroscopique, celui-ci provoque à l'inverse la dépolymérisation des gluténines à l'échelle moléculaire (Weegels et al., 1995; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001). Le lien qui unit ces deux phénomènes à priori antagonistes, comme l'argumentent Belton et Dobraszczyk (2006), reste encore à établir. Tout comme celui qui permettrait de réunir les diverses informations disséminées dans la multitude des résultats obtenus sur la pâte à pain, pour ensuite identifier les mécanismes de formation du gluten. Ce travail n'est pourtant pas évident, comme l'atteste l'état actuel de nos connaissances, car la pâte à pain est un système d'étude très complexe qui change de structure très rapidement et qui est le siège de réactions physico-chimiques nombreuses, simultanées et/ou superposées dans le temps, et très rapides. Un système farine-eau plus dilué, comme celui étudié par Anderson et Lancaster (1957) et Lancaster et Anderson (1958) dans les années 50, semblerait plus approprié à une telle étude.

L'objectif principal de cette thèse a donc été d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes et les lois qui président à l'agglomération des protéines du gluten au cours de l'opération de pétrissage de suspensions diluées de farine et d'eau. Cette étude doit permettre d'identifier et de comprendre comment les protéines du gluten s'agglomèrent entre elles. Cette connaissance scientifique doit ensuite permettre de maîtriser à la fois le degré et la cinétique de développement du réseau de gluten au sein d'une pâte diluée. Enfin, ce travail doit évaluer dans quelle mesure les concepts obtenus sur les pâtes diluées peuvent être généralisés et appliqués à la pâte à pain.

II. Démarche et Outils

L'originalité du travail repose avant tout sur le système d'étude, à savoir les suspensions farine-eau diluées, ou pâtes diluées. Comme l'ont montré Lancaster et Anderson (1958), une telle pâte présente un temps de développement optimal qui peut facilement nécessiter 30-60 min de pétrissage. Dans ces conditions, on peut logiquement espérer que les mécanismes impliqués dans l'agglomération du gluten soient ralentis, permettant ainsi un suivi plus précis des modifications sur une gamme de temps plus large. De plus, dans le cas des pâtes diluées, on peut également espérer dissocier dans le temps les différents processus menant à l'agglomération du gluten, dont notamment l'effet de l'hydratation des constituants de la farine et celui de l'apport d'énergie mécanique. Ceci a pour objectif de révéler ensuite l'influence spécifique de chacun des facteurs du procédé de pétrissage. Toutefois, depuis les premiers travaux d'Anderson et Lancaster (1957), très peu d'études se sont intéressées au pétrissage de pâtes diluées (Robertson et al., 2000; Robertson et al., 2006).

La démarche générale de l'étude repose sur l'analyse en parallèle de deux systèmes: la pâte et le gluten extrait de cette dernière. Dans les deux systèmes, l'analyse s'est focalisée uniquement sur les protéines, par des méthodes d'analyse tout à fait classiques et couramment utilisées sur la pâte à pain.

- **La pâte** a été étudiée car c'est le siège des modifications physico-chimiques permettant l'agglomération des protéines. Celles-ci ont majoritairement été étudiées par SE-HPLC pour suivre l'évolution de la distribution de taille des protéines au sein de la pâte, notamment celle des gluténines. L'agglomération du gluten a également été suivie par la mesure du couple exercé par la pâte sur le bras du pétrin, permettant ainsi d'identifier l'état de développement optimal du réseau de gluten et de mesurer le temps de pétrissage nécessaire à son obtention. Enfin, l'ajout d'un colorant spécifique des protéines, dès le début du pétrissage, a été utilisé pour suivre *in situ* les changements de forme et de taille des protéines se produisant au cours du pétrissage et pouvoir ainsi quantifier les modifications de taille provoquées par le pétrissage.
- **Le gluten** a été étudié car c'est le matériel résultant de l'agglomération des protéines. Pour l'extraire, nous avons choisi d'appliquer une procédure standardisée de lavage et de tamisage la plus douce possible pour modifier au minimum le degré d'agglomération induit par la seule opération de pétrissage. Cette condition était

absolument nécessaire pour l'étude, quelle que soit la pureté du gluten récupéré ensuite. Le suivi du degré d'agglomération des protéines induit par le pétrissage a été effectué en mesurant le rendement d'extraction protéique sur trois tamis de maillage différent (200-400-800 μm). La teneur en protéine du gluten a été mesurée par Kjeldhal pour suivre sa pureté et, par conséquent, évaluer la facilité de séparation de l'amidon et du gluten au cours du pétrissage. Les protéines du gluten ont également été fractionnées par SE-HPLC pour déterminer leur distribution de taille et comparer les résultats obtenus sur le gluten à ceux obtenus sur la pâte d'origine. Enfin, des mesures rhéologiques ont été appliquées au gluten pour évaluer ses propriétés visco-élastiques et les relier à sa composition biochimique.

A l'aide de ces outils, nous avons choisi d'orienter l'étude des mécanismes d'agglomération du gluten se produisant au cours du pétrissage selon trois axes principaux:

- **L'identification** des phénomènes d'agglomération des protéines se produisant dans les pâtes diluées, système très peu étudié dans la littérature. Ceci a été réalisé par le suivi de la coloration des protéines au cours du pétrissage.
- **Le contrôle paramétrique** du développement optimal du réseau de gluten. Cette étude, réalisée par le suivi du couple au cours du pétrissage, avait pour but d'établir les lois d'action des paramètres du procédé de pétrissage (hydratation et vitesse) sur le temps de développement optimal du réseau de gluten. Elle a été approfondie par la calibration du pétrin pour avoir une meilleure connaissance du système de pétrissage utilisé et pouvoir ensuite transférer plus facilement les résultats obtenus à d'autres systèmes de pétrissage.
- **Le suivi de l'agglomération des protéines au cours du pétrissage.** Cette étude a nécessité l'utilisation de tous les outils présentés précédemment. Elle avait pour but d'identifier les modifications biochimiques responsables de l'agglomération des protéines et de voir dans quelle mesure la conduite du procédé de pétrissage influence les modifications observées.

III. Résultats

III.1. Une agglomération des protéines du gluten en deux étapes

Comme nous l'avons présenté précédemment dans le manuscrit (**Chapitre 1**), très peu de données existaient dans la littérature sur le pétrissage des pâtes diluées avant le début de cette étude, offrant ainsi un domaine de recherche et d'investigation très vaste. A l'échelle macroscopique, la structure d'une suspension farine-eau diluée évolue au cours du pétrissage. Une courbe de pétrissage classique obtenue sur une pâte diluée fait apparaître cinq phases successives bien distinctes (Fig. 5.1), qui ont largement été décrites dans les **Chapitres 2A et 4A**: la phase de 1^{ère} descente du couple, la phase de latence, la phase de montée au pic, l'optimum de développement de la pâte et la phase de sur-pétrissage. Les trois phases précédant l'optimum de développement correspondent aux conditions de sous-pétrissage de la pâte.

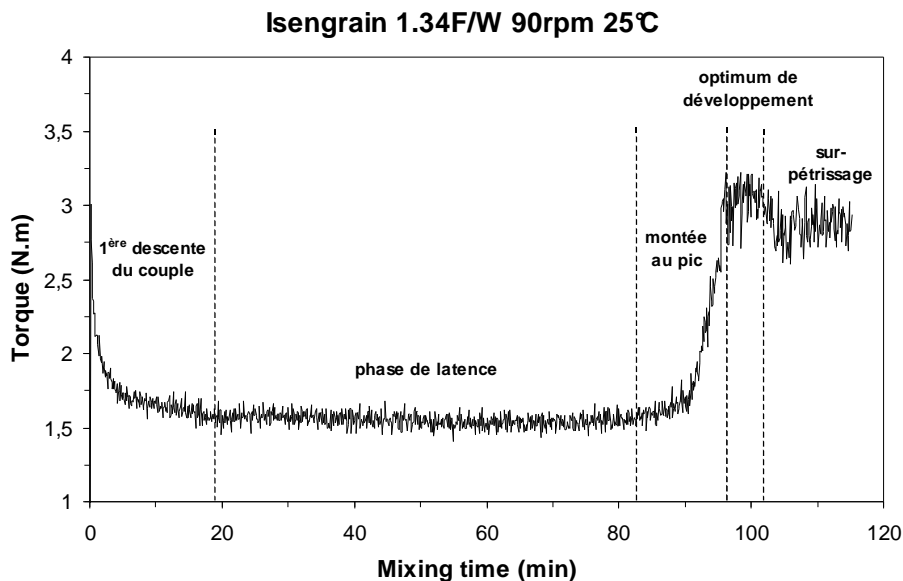


Fig. 5.1. Courbe de pétrissage classique obtenue pour une pâte diluée de farine et d'eau.

Par l'ajout d'un colorant spécifique des protéines dans la pâte (**Chapitres 2A et 4B**), cette étude a montré que le développement macroscopique de la pâte est directement relié à la microstructure des protéines du gluten qu'elle contient.

Au tout début du pétrissage, les protéines du gluten se présentent sous la forme de petites particules (50-100 μm), qui présentent une taille déjà supérieure à celle des grains d'amidon (2-30 μm). Ces observations portent sur des pâtes ayant déjà subies au moins 4 min de pétrissage. Vu la rapidité de l'agrégation des protéines observée dans la première phase du pétrissage, on est en droit d'estimer que leur taille initiale dans la farine ne dépasserait pas le micromètre. Les particules observées au début du pétrissage grossissent considérablement pour atteindre des tailles supérieures à plusieurs centaines de microns. On parle alors d'agrégats de gluten car cette augmentation de taille ne résulte pas seulement d'un simple effet de gonflement des protéines par hydratation, mais résulte surtout d'une agglomération entre des particules initialement submicroniques, comme l'atteste la diminution du nombre de particules se produisant au cours du pétrissage (**Chapitre 4B**). Cette phase de formation des agrégats de gluten s'initie dès les premiers instants de la phase de 1^{ère} descente du couple, durant laquelle l'eau se répartit de façon homogène entre chacun des constituants de la farine.

Toutefois la taille des agrégats de gluten continue à croître de façon continue tout au long de la phase de latence et les agrégats commencent à se déformer et à se filamenter de manière discrète. En sous-pétrissage, la pâte peut alors être assimilée de façon inédite dans la littérature à une suspension, constituée de très nombreux grains d'amidon, sphères dures non déformables, d'agrégats de gluten moins nombreux que les grains d'amidon mais déformables, et d'un fluide porteur visqueux constitué essentiellement de l'eau, des arabinoxylanes et des protéines solubles du blé. Comme l'atteste le faible bruit de fond des valeurs de couple observées pendant la phase de latence (Fig. 5.1), la pâte présente alors peu de propriétés élastiques.

Après une phase de latence plus ou moins longue, tous les agrégats de gluten se transforment ensuite massivement en filaments de gluten. Cette transition brutale et généralisée provoque la structuration macroscopique de la pâte qui se traduit par la phase de montée au pic. L'optimum de développement de la pâte est obtenu quand tous les agrégats de gluten se sont transformés en filaments de gluten. La pâte est alors constituée d'un réseau de filaments de gluten englobant la totalité de l'eau, des grains d'amidon et des autres constituants de la farine, comme observé sur la pâte à pain (Amend et Belitz, 1991). Ce n'est qu'à partir de la formation des filaments de gluten que la pâte devient élastique (Fig. 5.1).

Les filaments de gluten persistent durant la totalité du sur-pétrissage mais deviennent de plus en plus fins et se répartissent de façon plus homogène autour de chacun des grains d'amidon. Le suivi de la coloration *in situ* des protéines du gluten a ainsi permis de mettre en évidence que le développement du réseau de gluten au sein d'une pâte diluée repose sur deux processus successifs, qui s'opèrent à l'échelle microscopique: la formation des agrégats de gluten et leur filamentation.

III.2. Une agglomération liée à la dépolymérisation des gluténines

Le pétrissage provoque une modification de la structure des protéines du gluten à l'échelle moléculaire. Comme observé sur la pâte à pain (Weegels et al., 1995; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001; Don et al., 2003), le pétrissage provoque la dépolymérisation des larges polymères de gluténine insolubles dans le SDS (**Chapitres 3A et 4A**). Le terme "dépolymérisation" est toutefois utilisé ici de façon générique pour désigner la diminution en taille des gluténines, sans préciser aucunement son origine biochimique (rupture de ponts disulfures, hydratation des protéines, exposition des zones hydrophobes,...). La cinétique de dépolymérisation varie selon les conditions de pétrissage, mais, à l'optimum de développement de la pâte, quasiment tous les polymères de gluténine insolubles dans le SDS ont été dépolymérisés, et cela quelles que soient les conditions de pétrissage. Or, cet état de développement correspond au moment où le gluten se trouve uniquement sous la forme de filaments. De plus, les résultats obtenus pendant le sur-pétrissage de la pâte ont montré que cette quantité de polymères reste stable et minimale, en accord avec la présence des filaments de gluten au sein de la pâte.

Dans le **Chapitre 3B**, nous avons montré que la teneur du gluten en polymères de gluténine insolubles dans le SDS influence fortement l'élasticité du gluten. Un gluten très riche en cette fraction de gluténine présente une composante élastique élevée, tandis qu'un gluten pauvre en cette fraction de gluténine présente une composante élastique faible, en accord avec les résultats publiés dans la littérature (Cornec et al., 1994; Popineau et al., 1994, Lefebvre et al., 2000). Il nous semble ainsi pertinent de penser que, soumis à un niveau de contrainte équivalent, un gluten très élastique va emmagasiner cette contrainte, se déformer momentanément, et la restituer par un retour élastique à sa forme initiale dès lors que la contrainte sera supprimée. L'écoulement du gluten ne serait alors possible qu'après suppression de sa composante élastique. Ce concept simple permet d'expliquer pourquoi le

gluten ne se présente sous la forme de filaments au sein de la pâte que lorsque sa teneur en polymères de gluténine est quasiment nulle. Il reste toutefois qu'une meilleure connaissance de la relation entre la distribution en taille des polymères de gluténine et le temps de relaxation du gluten est à établir avant de pouvoir valider cette vision du mécanisme de formation des filaments.

Cette même vision des mécanismes est applicable sur les agrégats de gluten pour expliquer l'augmentation de leur taille observée durant la phase de latence dans le **Chapitre 4A-B**. Au début de cette phase, les agrégats de gluten sont très riches en polymères de gluténine insolubles dans le SDS et par conséquent très élastiques. La contrainte exercée par la pale du pétrin et par les grains d'amidon en mouvement dans le bol est alors majoritairement absorbée par la composante élastique de l'agrégat et celui-ci se déforme très peu. Le choc entre deux agrégats de gluten n'est alors pas efficace et, du fait d'un rebond élastique, ne conduit pas à leur agglomération. Toutefois, le pétrissage provoque la dépolymérisation progressive des larges polymères de gluténine, entraînant ainsi la diminution de l'élasticité intrinsèque des agrégats de gluten. Pour une même intensité de contrainte appliquée, les valeurs de couple étant stables pendant la phase de latence (Fig. 5.1), les agrégats vont progressivement être amenés à dissiper la contrainte en se déformant de façon irréversible. Le choc entre deux agrégats de gluten devient alors de plus en plus efficace et ces derniers peuvent alors s'agglomérer plus ou moins partiellement. Ce phénomène se poursuit jusqu'à ce qu'un nombre suffisant d'agrégats soient concernés par cette transformation physico-chimique et se structurent sous la forme de filaments. La percolation générale des agrégats de gluten débute alors et provoque une augmentation considérable du couple. Cela augmente l'intensité des contraintes appliquées sur les agrégats de gluten restants, ce qui entraîne la filamentation massive et accélérée de la totalité des agrégats, par effet boule de neige.

Il n'est toutefois pas clair, avec les outils de prise d'image utilisés, si l'augmentation de taille des agrégats de gluten résulte vraiment d'une adsorption des particules ou d'une absorption-fusion. Il semble tout de même, par des observations faites sous loupe binoculaire (grossissement x5-x10), que les agrégats de gluten seraient constitués d'une infinité de particules protéiques submicroniques assemblées en agrégats microscopiques, eux-mêmes à la base des agrégats de gluten que nous observons dans la pâte. Ceci nous laisse penser que les agrégats de gluten présenteraient une organisation fractale (Mandelbrot, 1973). De plus, le

Chapitre 4A a montré que la proportion de gluténine, gliadine, albumine et globuline dans les glutens reste constante tout au long du pétrissage. On peut ainsi définir une théorie qui présente le gluten comme un matériau constitué par l'assemblage progressif de "briques de base" de composition protéique stable et identique, comprenant une proportion fixe de gluténine et de gliadine. La formation des filaments de gluten pourrait provenir d'une réorganisation interne de ces briques et de leur alignement progressif pour s'adapter aux fortes contraintes externes. A l'optimum de développement, plusieurs couches de briques pourraient encore être superposées, formant ainsi des filaments épais. Le sur-pétrissage de la pâte continuerait d'aligner ces briques jusqu'à l'obtention de filaments de gluten très fins constitués d'une couche unique de briques toujours en interactions. Ces briques finiraient par se disperser en sur-pétrissage sous l'effet des tensions générées par l'inertie du réseau. Ces briques ultimes ne seraient plus constituées que de polymères de gluténines alignés, expliquant ainsi l'augmentation du ratio gluténine/gliadine observé dans les situations de sur-pétrissage (**Chapitre 4A**). Des recherches poussées sont évidemment à prévoir pour valider ou infirmer cette hypothèse.

L'étude de la création de structures anisotropiques sous cisaillement, à partir d'objets Browniens ou non, est aujourd'hui un des champs d'investigation en plein développement de la Physique de la matière molle condensée. L'utilisation de techniques rhéo-optiques, couplant l'application de contraintes de cisaillement sous un rhéomètre à l'observation du matériel cisailé, a permis de révéler l'organisation à des échelles centimétriques d'objets nanométriques ou micrométriques initialement dispersés (Pignon et al., 1997; Lin-Gibson et al., 2004; Montesi et al., 2004; Vermant et Salomon, 2005). Dans ces phénomènes, le rôle organisateur des écoulements hydrodynamiques est prépondérant, par-delà les forces d'attraction entre les objets (Osuji et Weitz, 2007).

L'hypothèse selon laquelle la dépolymérisation des gluténines augmente la capacité agglomérante du gluten est en accord avec d'autres résultats obtenus dans l'étude. Notamment, nous avons observé dans le **Chapitre 4B** que la variété Orvantis forme rapidement de très gros agrégats de gluten. Or, dans le **Chapitre 4A**, nous avons remarqué que la cinétique de dépolymérisation des larges polymères de gluténine est très rapide pour cette variété. Dès le début du pétrissage, la teneur de la pâte Orvantis en polymères de gluténine insolubles dans le SDS décroît brutalement. D'autre part, nous avons montré que la teneur en protéines des différents glutens diminue progressivement au cours du sous-

pétrissage. Ce résultat montre que les grains d'amidon se trouvent progressivement emprisonnés dans les agrégats de gluten, en accord avec une augmentation de leur capacité agglomérante.

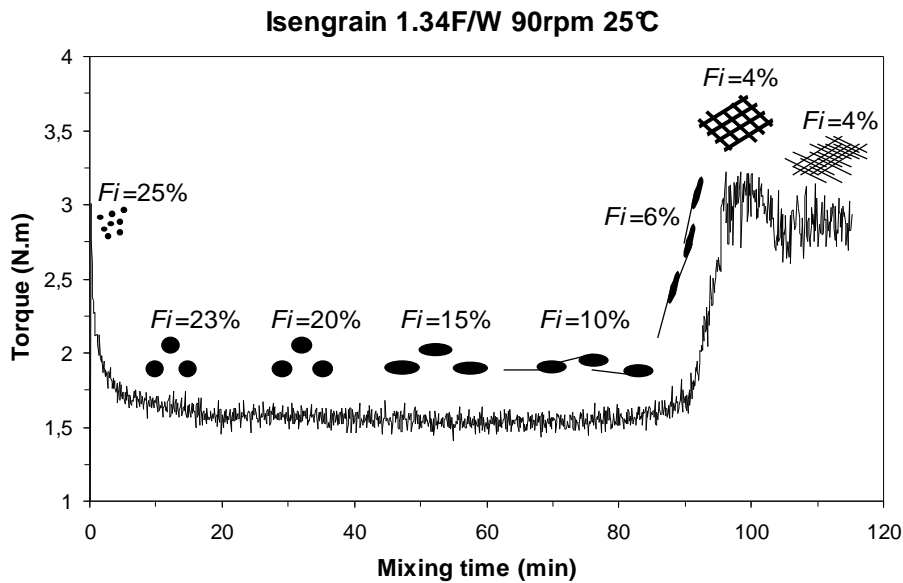


Fig. 5.2. Schéma de l'agglomération des protéines du gluten au cours du pétrissage, en fonction de la dépolymérisation des polymères de gluténine insolubles dans le SDS (F_i).

Le mécanisme schématisé dans la Fig. 5.2 illustre comment le pétrissage, qui provoque la dépolymérisation des larges polymères de gluténine à l'échelle moléculaire, favorise dans le même temps l'agglomération des protéines du gluten à l'échelle microscopique. Les mécanismes permettant le changement de structure entre l'agrégat et le filament de gluten restent toutefois à être identifiés de façon plus précise. Cependant, tous les résultats obtenus montrent que le gluten ne se retrouve sous sa forme filamenteuse que lorsque la quasi-totalité des polymères de gluténine insolubles dans le SDS a été dépolymérisée.

III.3. Les mécanismes de dépolymérisation possibles des gluténines

Cette étude a révélé le rôle important joué par les polymères de gluténine insolubles dans le SDS. Dans la littérature concernant la pâte à pain, il est bien connu que ces fractions sont dépolymérisées par les fortes contraintes exercées par le pétrin (Weegels et al., 1995; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001; Don et al., 2003). Cette dépolymérisation est d'ailleurs un phénomène forcé car, dès que le pétrissage est interrompu et que la pâte est

laissée au repos, les gluténines se repolymérisent aussitôt (Weegels et al., 1997; Skerritt et al., 1999; Aussenac et al., 2001).

La situation est plus complexe dans le cas des pâtes diluées car l'étude présentée dans les **Chapitres 3A** et **4A** a montré que deux autres voies de dépolymérisation des gluténines, directes et/ou indirectes, sont possibles dans le cas des pâtes diluées. Le schéma réactionnel général proposé est présenté dans la Fig. 5.3. Ce schéma réactionnel est inédit dans la littérature et les résultats obtenus dans les **Chapitres 3A** et **4A** ont permis de vérifier sa validité sur la totalité du pétrissage.

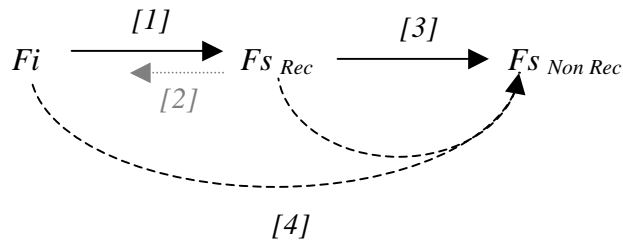


Fig. 5.3. Schéma réactionnel général présentant les quatre voies possibles de dépolymérisation des polymères de gluténine insolubles dans le SDS (Fi) en polymères de gluténine solubles dans le SDS repolymérisables (Fs_{Rec}) et non repolymérisables ($Fs_{Non Rec}$).

Dans ce schéma réactionnel, on retrouve la réaction [1] qui assure la dépolymérisation directe des gluténines par l'action mécanique du pétrin. Plus la contrainte appliquée sur la pâte – relative au couple - est élevée, plus l'amplitude de la réaction [1] est forte, et plus la dépolymérisation totale des gluténines, condition nécessaire au développement optimal de la pâte, est rapide. Grâce à la vision de la pâte comme une suspension de sphères molles déformables (agrégats de gluten) entourées de sphères dures non déformables (grains d'amidon) (**Chapitre 2A**), on comprend facilement que les agrégats de gluten vont subir un laminage de la part des grains d'amidon et un cisaillement de la part de la pale d'autant plus important que le couple de pétrissage sera élevé. La réaction [1] était déjà bien connue sur la pâte à pain avant l'étude des pâtes diluées (Don et al., 2005b). Il en est de même pour la réaction antagoniste [2], qui a déjà fait l'objet de plusieurs études (Don et al., 2005b; Peressini et al., 2007), mais qui était jusqu'à présent uniquement présentée comme agissant au cours du repos de la pâte, et pas directement au cours du pétrissage.

Dans le **Chapitre 4A**, nous avons montré que cette réaction retour [2] joue un rôle prépondérant dans le développement d'une pâte diluée. Dans cette étude, nous avons montré que l'ajout d'un bloqueur de thiols (NEMI) empêche la repolymérisation des gluténines mais surtout qu'il accélère énormément le développement du réseau percolant de gluten, et diminue le temps de développement de 100 min à 20 min pour l'expérience avec NEMI, sans toutefois modifier les valeurs de couple avant la phase de montée au pic, *i.e.* sans modifier la contrainte exercée par le pétrin dans les deux expériences. Ces résultats montrent que le mécanisme de repolymérisation des gluténines ralentit la filamentation du gluten car il contre-carre la cinétique de dépolymérisation des gluténines. Dans le **Chapitre 2B** concernant la calibration du pétrin P600 utilisé dans cette étude, nous avons montré que le cisaillement provoqué par la pale est très transitoire. En effet, la nature du mouvement planétaire fait en sorte qu'une zone du bol n'est pas cisailée de façon continue, mais selon une certaine fréquence qui dépend de la vitesse de pétrissage. De plus, la vitesse de rotation de la pale n'est pas uniforme au sein du bol: elle est plus élevée au centre du bol qu'à sa périphérie. Cette géométrie particulière du pétrin utilisé autorise donc des phases de cisaillement, durant lesquelles les gluténines vont être dépolymérisées, et des phases de repos, durant lesquelles les gluténines vont se repolymériser. Cette géométrie renforce l'emprise de la réaction [2] sur la dynamique de prise de pâte.

Dans le cas des pâtes diluées, la dépolymérisation des gluténines peut également s'effectuer par une voie indirecte, la réaction [3]. Cette réaction s'oppose à la repolymérisation des gluténines solubilisées par le pétrissage en polymères insolubles dans le SDS. Dans les **Chapitres 3A** et **4A**, nous avons montré que cette réaction est sous le contrôle de la déformation cumulée. En ce sens, cette réaction n'est révélée que pour les pâtes diluées, qui nécessitent des temps de pétrissage très longs. Elle est d'ailleurs primordiale pour le développement des pâtes très diluées. De telles pâtes étant quasiment liquides, l'action mécanique du pétrin est alors faible. L'impact de la réaction [1], qui reste modéré, est facilement contre-balançé par la réaction [2]. Sans l'existence de la réaction indirecte [3], la dépolymérisation totale des gluténines serait alors impossible et la pâte ne se développerait jamais. Le fait que cette réaction [3], qui provoque le blocage des thiols engagés dans des ponts disulfures intermoléculaires (**Chapitre 3A**), soit sous le contrôle du temps de mélange laisse supposer qu'un mécanisme d'oxydation des thiols par l'oxygène serait en jeu dans cette réaction. Cette hypothèse demande toutefois à être vérifiée par la suite, par un ajout continu d'oxygène au cours du pétrissage d'une pâte diluée.

Enfin, une troisième voie de dépolymérisation des gluténines existe, par la réaction [4]. Cette voie, inédite dans la littérature, reste toutefois très particulière car elle ne s'exprime pas pour toutes les variétés de blé. Dans notre étude (**Chapitres 3A et 4A**), limitée à trois variétés de blé, nous avons montré qu'elle n'existe que pour la variété Orvantis et pas pour les variétés Caphorn et Isengrain. Cette réaction semble être sous le contrôle d'un facteur variétal, et pourrait être liée à la présence d'un constituant spécifique de la farine. Toutefois, une étude plus approfondie reste à faire pour déterminer les causes et les lois qui président à cette réaction. Aujourd'hui, il n'est pas non plus très clair si cette réaction permet une dépolymérisation directe ou indirecte des gluténines (Fig. 5.3).

La dépolymérisation totale des gluténines, condition nécessaire au développement optimal de la pâte, est donc le résultat de plusieurs réactions physiques et chimiques, liées de façon directe ou indirecte à l'opération de pétrissage.

III.4. Le contrôle du développement optimal du réseau de gluten

Un des objectifs de l'étude consistait à prédire le temps de développement optimal du réseau de gluten au sein de la pâte. Avant d'initier cette étude, seul un contrôle paramétrique était envisagé. Aujourd'hui, l'identification des mécanismes impliqués dans la dépolymérisation des gluténines (Fig. 5.3) nous permet d'envisager également un contrôle biochimique du développement optimal du réseau de gluten, en supprimant la réaction [2] ou en favorisant les réactions [3] et [4]. Au cours du **Chapitre 4A**, nous avons montré que la suppression de la réaction [2] est opérationnelle dès maintenant en ajoutant un bloqueur de thiols, tel que le NEMI. Son utilisation n'est toutefois pas recommandée pour des applications alimentaires et un substitut, autorisé comme additif alimentaire, devra être trouvé pour le remplacer. L'étude de la réactivité de tels substituts sur le développement de la pâte serait d'ailleurs un axe de recherche très intéressant dans le but d'identifier plus précisément les mécanismes impliqués dans le contrôle de la réaction [2]. Favoriser les réactions [3] et [4] n'est par contre pas opérationnel dès aujourd'hui. A part augmenter considérablement le temps de mélange, ce qui n'a pas d'intérêt en soit, il serait intéressant de vérifier si la réaction [3] - et peut-être aussi la réaction [4] - est bien sous le contrôle de mécanismes d'oxydation des thiols.

Le contrôle paramétrique du développement optimal du réseau de gluten est toutefois possible, comme l'a montré l'étude présentée dans le **Chapitre 2A**. Derrière les effets de l'hydratation et de la vitesse de pétrissage, nous avons montré que le paramètre déterminant du développement de la pâte est la puissance instantanée délivrée par le pétrin pendant la phase de latence. Cette puissance s'exprime par le produit du couple obtenu pendant la phase de latence (Γ_b) avec la vitesse de pétrissage (N). La relation de dépendance est reprise dans la Fig. 5.4 pour les trois variétés étudiées.

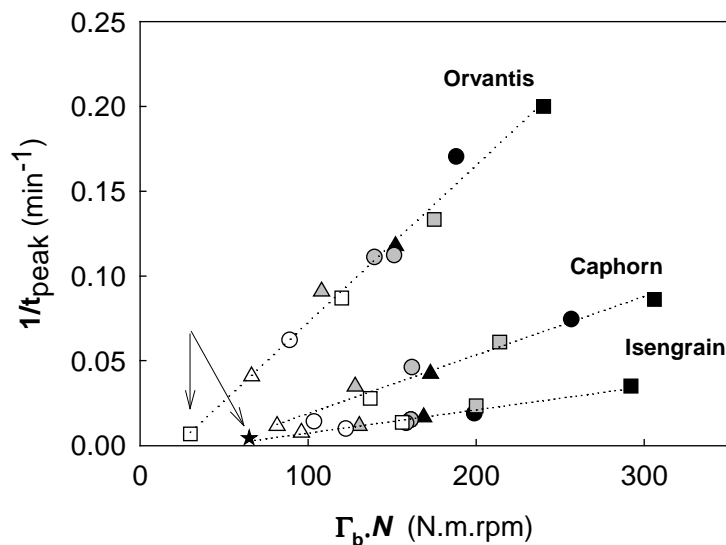


Fig. 5.4. Prédiction du temps de développement optimal de la pâte (t_{peak}) en fonction de la puissance instantanée délivrée par le pétrin pendant la phase de latence ($\Gamma_b \cdot N$) pour les variétés de blé Orvantis, Caphorn et Isengrain. Données obtenues à 25°C pour des vitesses de pétrissage de (Δ) 80 rpm, (\circ) 90 rpm et (\square) 100 rpm et pour des ratios farine/eau (F/W) données dans la Fig. 2A.1d-f du **Chapitre 2A**: (symboles noirs) ratio F/W élevé; (symboles gris) ratio F/W intermédiaire; (symboles blancs) ratio F/W faible. Les flèches présentent des expériences supplémentaires présentées dans le **Chapitre 2A**.

Une fois établie, cette relation est pratique pour prédire le temps de développement de la pâte pour une nouvelle vitesse de pétrissage. Toutefois, cette relation nécessite de connaître la valeur du couple obtenu pendant la phase de latence et, de plus, l'équation générale constitutive n'est pas univoque mais varie d'une variété de farine à l'autre (Fig. 5.4). Ainsi, pour une même valeur de $\Gamma_b \cdot N$, Orvantis se développe plus rapidement que Caphorn, et encore plus rapidement qu'Isengrain. Pour exploiter au mieux la relation établie dans la Fig. 5.4, il faudrait donc par la suite identifier les constituants de la farine responsables à la fois de la différence variétale et de la consistance de la pâte pendant la phase de latence.

Grâce à la calibration du pétrin P600 utilisé (**Chapitre 2B**), nous avons montré que la puissance instantanée délivrée par le pétrin pendant la phase de latence peut s'exprimer en fonction de la viscosité de base de la pâte, exprimée en Pa.s, et de la vitesse de cisaillement moyenne, exprimée en s^{-1} , selon l'équation suivante:

$$\Gamma_b \cdot N = (K_p \cdot d_G^3 / 2\pi \cdot K_s^2) \cdot (\eta_b \cdot \dot{\gamma}^2) \quad (1)$$

où K_p et K_s sont les constantes de calibration du pétrin et d_G est une dimension propre à la géométrie du pétrin (voir **Chapitre 2B**).

Cette équation ouvre de nouvelles perspectives pour rapprocher des études menées sur des rhéomètres avec les études menées sur le pétrin P600, et vice-versa. Comprendre ce qui détermine la viscosité d'une suspension farine-eau diluée est un point clef dans la prédiction du développement optimal de la pâte (Fig. 5.4), mais une telle étude aurait davantage de chance d'aboutir si elle était réalisée sur des rhéomètres, de type Couette ou cône-plan selon l'hydratation de la pâte, plutôt que sur le pétrin P600, pour des questions de précision des mesures et de quantité de farine nécessaire. D'un point de vue scientifique, déterminer la viscosité d'une suspension complexe constituée de "sphères" molles hétérogènes en taille, de sphères rigides de distribution bimodale en taille, et d'un fluide porteur visqueux et rhéofluidifiant est un challenge tout à fait intéressant dont les retombées industrielles seraient considérables pour expliquer la viscosité d'autres fluides complexes, comme les boues d'épuration ou les bétons. Au vu des connaissances actuelles sur les capacités d'absorption d'eau des constituants de la farine (**Chapitre 1**), les arabinoxylanes peuvent déjà rendre compte de la viscosité du fluide porteur.

Un contrôle biochimique et paramétrique du développement optimal du réseau de gluten est par conséquent envisageable sur le pétrin P600 utilisé dans cette étude. Il est toutefois plus que possible que les mécanismes et les lois de comportement présentés dans l'étude soient dépendants de la géométrie du système de pétrissage, d'où l'intérêt de bien connaître la géométrie du pétrin et son mode d'agitation. Cela passe par des études modèles, du type calibration ou modélisation des écoulements. La calibration du pétrin P600 proposée dans le **Chapitre 2B** a montré que ce pétrin assure une sollicitation transitoire de la pâte et que la vitesse de la pale, donc celle du gradient de cisaillement, évolue de façon sinusoidale

au sein du bol. L'amplitude des sinusoïdes augmente d'ailleurs avec la vitesse de pétrissage. Par son mouvement planétaire, ce pétrin permet également de modifier sans cesse la direction des écoulements, ce qui améliore l'homogénéisation, le brassage et les possibilités de contact entre les constituants de la pâte. Ce mouvement planétaire, couramment utilisé pour monter les blancs d'œufs en neige, semble donc approprié pour incorporer de l'air dans la pâte, ce qui pourrait favoriser les phénomènes d'oxydation. Enfin, ce mouvement planétaire semble être bien adapté pour répartir les filaments de gluten de façon très homogène au sein de la pâte, à la manière d'un métier à tisser.

III.5. Application des concepts obtenus à la pâte à pain

La différence majeure entre la pâte à pain et la pâte diluée réside dans la consistance de la pâte et, par conséquent, dans la proximité des particules de gluten et des grains d'amidon. L'autre différence majeure concerne la courbe de pétrissage qui, dans le cas de la pâte à pain, ne présente ni la phase de 1^{ère} descente du couple, ni la phase de latence (Fig. 5.5). Ainsi, les particules de protéines de la farine ont à peine le temps de s'hydrater qu'elles sont déjà cisailées et déformées par l'action mécanique du pétrissage, qui provoque leur filamentation après un temps de pétrissage très court. Ceci explique que le couple augmente aussitôt dans le cas de la pâte à pain (Fig. 5.5).

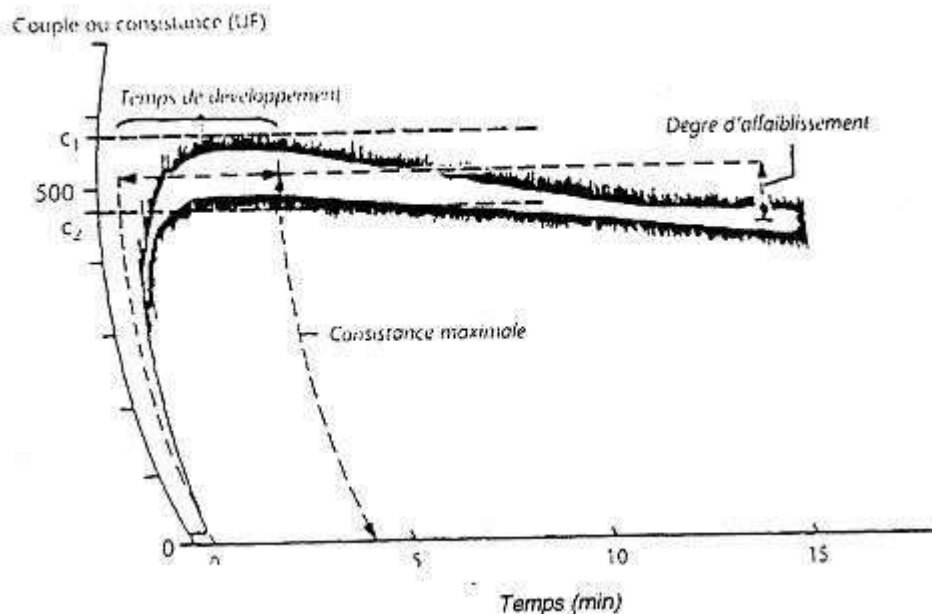


Fig. 5.5: Courbe de développement d'une pâte farine-eau obtenue à l'aide du farinograph Brabender (d'après Launay et Bartolucci, 1997).

Cette action mécanique est fortement liée à la consistance de la pâte. La proximité des agrégats protéiques déformables et des grains d'amidon fait de la pâte à pain une pâte granulaire, selon la définition qu'en a donné Coussot (2005). Les contraintes appliquées sur les agrégats protéiques sont très élevées et proviennent à la fois du cisaillement de la pale mais également du laminage incessant des nombreux grains d'amidon. Ce laminage est individuel quand la fraction volumique des grains d'amidon dans la pâte est inférieure à la limite d'empilement maximal des grains. Toutefois, ce laminage peut devenir collectif dans le cas des pâtes à pain très concentrées, dans lesquelles la fraction volumique en grains d'amidon avoisine alors la limite d'empilement maximal. Sous cisaillement, un tel système peut présenter des phénomènes de dilatance, ou "jamming transition" (Kieffer et Stein, 1999; Kieffer, 2006a,b; Abdoulaye Fall et al., 2008).

La dépolymérisation des gluténines est alors forcée et semble ainsi être uniquement contrôlée par la réaction [1] du mécanisme proposé dans le **Chapitre 3A**, les réactions [3] et [4] n'ayant pas le temps d'intervenir. Comme l'ont montré Don et al. (2005) et Peressini et al. (2007), la réaction [2] existe dans le cas de la pâte à pain mais l'importance de la réaction [1] en masque les effets. Dans le cas de la pâte à pain, le développement de la pâte serait donc forcé par le pétrissage qui filamenterait directement les agrégats de gluten initialement très proches les uns des autres (percolation de site). Dans le cas des pâtes diluées, nous avons montré que la filamentation des agrégats était davantage le résultat d'un mécanisme chimique (réaction [3]) et que le développement de la pâte n'intervient que lorsque tous les agrégats sont suffisamment filamenteux pour entrer en contact (percolation de lien).

A l'optimum de développement de la pâte à pain, le gluten se trouve également sous la forme de filaments (Amend et Belitz, 1991), comme dans le cas de la pâte diluée, mais ces filaments doivent être plus larges et répartis de façon plus hétérogène dans la pâte à pain selon les résultats obtenus dans le **Chapitre 4B**. Le sur-pétrissage d'une pâte à pain permet ainsi une meilleure répartition des filaments de gluten au sein de la pâte. D'autre part, comme le sur-pétrissage allonge les temps de mélange, la réaction [3] interviendrait alors et expliquerait la faible repolymérisation des gluténines observée par Don et al. (2005) uniquement dans le cas de pâtes à pain sur-pétrées laissées au repos.

CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette étude visait à améliorer nos connaissances sur les mécanismes d'agglomération du gluten se produisant au cours du pétrissage d'une pâte diluée de farine et d'eau.

Nous avons montré que le développement d'une telle pâte est le résultat de mécanismes se produisant à différents niveaux d'échelle. A l'échelle macroscopique, la pâte évolue d'une suspension particulaire diluée très peu élastique en sous-pétrissage à un réseau percolant très élastique à l'optimum de pétrissage. En sur-pétrissage, ce réseau perd progressivement de son élasticité au profit d'une plus grande plasticité. Nous avons mis en évidence que ces modifications de structure reposent sur une évolution de la phase gluten se produisant au cours du pétrissage à l'échelle microscopique. Deux organisations du gluten ont été observées: pendant le sous-pétrissage, le gluten se présente sous la forme d'agrégats protéiques, qui grossissent progressivement et se transforment alors en filaments visco-élastiques, qui s'amincissent ensuite au cours du sur-pétrissage. C'est d'ailleurs la transition massive de tous les agrégats de gluten en filaments qui est responsable de l'augmentation soudaine de la consistance et de l'élasticité de la pâte. Nous avons montré que cette évolution de structure est directement reliée à une modification biochimique des protéines se produisant à l'échelle moléculaire: la dépolymérisation des larges polymères de gluténine insolubles dans le SDS. L'étude suggère fortement que cette dépolymérisation progressive, qui diminue l'élasticité du gluten et augmente sa déformabilité, augmenterait d'une part la capacité agglomérante des agrégats de gluten et favoriserait leur filamentation.

Cette étude n'a toutefois pas permis d'étudier précisément la structure interne des agrégats et des filaments de gluten. Aujourd'hui, nous supposons que les agrégats sont des objets fractals constitués de l'interaction d'une multitude de particules protéiques subméttriques. Pour le vérifier, il faudrait utiliser des techniques d'imagerie plus précises que celles utilisées dans cette étude. Pour cela, nous suggérons la stéréo-microscopie qui permet d'étudier des objets assez larges (50-300 μm) sur une fenêtre d'observation similaire à celle couverte dans l'étude (1-2 cm^2). Pour analyser plus finement la structure d'un seul agrégat, nous suggérons la cryofracture ou la microscopie confocale qui présente le double intérêt de pouvoir analyser l'échantillon de pâte tel quel, sans avoir à le sécher avant analyse, et de pouvoir reconstituer l'image tridimensionnelle de l'agrégat de gluten. Ces techniques sont toutefois très précises et ne permettent pas de balayer une surface d'observation très large. Pour cette raison, elles seraient complémentaires à la stéréo-microscopie. Au cours d'une telle

étude, il serait également fort intéressant de marquer spécifiquement les protéines bien sûr, mais aussi l'amidon et surtout les arabinoxyanes pour connaître leur distribution de phase au sein d'une pâte diluée.

A cette analyse précise de la structure des agrégats pourrait s'ajouter en parallèle un suivi rapide de leur distribution de taille au sein de la pâte. Dans cette étude, nous avons montré les limites techniques de la détermination de taille des agrégats par analyse d'images. Pour la suite, nous suggérons d'opter pour des techniques par rétrodiffusion de la lumière, type Turbiscan, ou d'utiliser des granulomètres laser. Cependant, ces techniques nécessitent généralement une dilution importante des échantillons dont l'effet devra être évalué. Il faudra également voir si la présence des nombreux grains d'amidon ne perturbe pas trop la mesure et s'assurer que les agrégats de gluten ne colmatent pas ou n'obstruent pas la cellule de mesure et le circuit d'alimentation.

Au cours de cette étude, nous avons également fait l'hypothèse que les agrégats de gluten se déformeraient à la fois sous la contrainte du cisaillement et par le laminage des grains d'amidon. Des expériences de rhéo-optique seraient intéressantes pour étudier visuellement le comportement des agrégats protéiques sous des conditions de cisaillement contrôlées. Cette étude devrait être accompagnée de la modélisation des écoulements se produisant dans le pétrin P600. Cette double étude permettrait d'approfondir notre connaissance sur les types de déformation et de sollicitation mécaniques propices à la filamentation du gluten.

Ce travail nous a également permis de proposer un schéma réactionnel original et inédit qui présente les voies de dépolymérisation possibles des gluténines au cours du pétrissage. Ce schéma fait apparaître quatre réactions distinctes. La première assure la dépolymérisation directe des gluténines par l'action mécanique du pétrissage. La seconde permet au contraire la repolymérisation des gluténines, par formation ou réorganisation de liaisons disulfures. La troisième est une voie indirecte qui empêche la repolymérisation des gluténines. Nous avons montré que cette réaction est favorisée par des temps de mélange élevés, laissant supposer qu'elle soit finalement contrôlée par des mécanismes d'oxydation des thiols. Ce point reste toutefois à être approfondi par la suite. Pour cela, nous proposons de pétrir une pâte diluée sous bullage d'oxygène. Nous proposons également de reprendre les expériences d'ajout d'agents oxydants déjà menées sur la pâte à pain et de les mener à présent sur les pâtes diluées. Enfin, la quatrième voie est celle que l'on connaît aujourd'hui le moins.

Cette voie permet la dépolymérisation directe ou indirecte des gluténines mais nous avons surtout montré quelle est spécifique à certaines variétés de blé, comme Orvantis. Par la suite, il faudrait savoir si d'autres variétés de blé présentent cette réaction si spécifique et identifier ensuite les mécanismes ou les constituants de contrôle de cette réaction.

Enfin, nous avons montré que la connaissance de la viscosité de la pâte diluée durant la phase de latence permet de prédire le temps de développement optimal de la pâte pour une vitesse de pétrissage donnée. Cependant, nous n'avons pas cherché à prédire la valeur de cette viscosité à partir de la composition biochimique de la farine dans l'étude présentée ici. Il semble toutefois indispensable de mener une telle étude. Pour cela, nous proposons d'élargir considérablement la gamme de farines utilisées et de mener cette étude dans un premier temps sur des rhéomètres classiques, du type Couette ou cône-plan, qui présentent le double intérêt d'analyser de faibles quantités d'échantillon et de donner des valeurs de viscosité très précises. L'utilisation d'une grande diversité de farines permettrait également d'identifier les constituants responsables de la vitesse de développement d'une variété.

Cette étude montre donc que la pâte diluée est un système particulièrement bien adapté à l'étude des mécanismes d'agglomération du gluten se produisant au cours du pétrissage. Les résultats obtenus ont permis d'élargir nos connaissances sur un tel système, qui était très peu étudié dans la littérature avant cette étude. De plus, nous avons montré que les mécanismes proposés sur les pâtes diluées peuvent s'appliquer également à la pâte à pain, si l'on tient compte de la différence de consistance des deux systèmes. Cette étude ouvre la voie à d'intéressantes applications industrielles futures concernant la maîtrise du degré et de la cinétique d'agglomération des protéines du gluten.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- AACC, 2000. Approved Methods of the AACC, 10th ed. Methods 26-31, 44-15A, 08-01 and 54-21. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Aït Kaddour, A., Barron, C., Morel, M.H., Cuq, B., 2007. Dynamic monitoring of dough mixing using near-infrared spectroscopy: physical and chemical outcomes. *Cereal Chemistry* 84, 70-79.
- Amend, T., Belitz, H.D., 1991. Microstructural studies of gluten and a hypothesis on dough formation. *Food Structure* 10, 277-288.
- Anderson, R.A., Lancaster, E.B., 1957. Recording apparatus for measuring some mixing characteristics of flour-water batters. *Cereal Chemistry* 34, 379-388.
- Anderson, R.A., Pfeifer, V.F., Lancaster, E.B., 1958. Continuous batter process for separating gluten from wheat flour. *Cereal Chemistry* 35, 449-457.
- Anderson, R.A., Pfeifer, V.F., Lancaster, E.B., Vojnovich, C., Griffin, E.L., 1960. Pilot-plant studies on the continuous batter process to recover gluten from wheat flour. *Cereal Chemistry* 37, 180-188.
- Auger, F., Morel, M.H., Lefebvre, J., Dewilde, M., Redl, A., 2007. A parametric and microstructural study of the formation of gluten network in mixed flour-water batter. *Journal of Cereal Science*, doi: 10.1016/j.jcs.2007.10.006.
- Aussenac, T., Carceller, J.L., Kleiber, D., 2001. Changes in SDS solubility of glutenin polymers during dough mixing and resting. *Cereal Chemistry* 78, 39-45.
- Baig, M.M., Hosney, R.C., 1977. Effects of mixer speed, dough temperature, and water absorption on flour-water mixograms. *Cereal Chemistry* 54, 605-615.
- Baltsavias, A., Jurgens, A., van Vliet, T., 1999. Rheological properties of short doughs: effect of sucrose in relation to mixing time. *Journal of Cereal Science* 29, 43-48.
- Beccari, J., 1745. De frumento. De Bononiensi Scientarium et Artium Instituto atque Academia Comentarum 2, 122-127.
- Bechtel, D.B., Pomeranz, Y., de Francisco, A., 1978. Breadmaking studied by light and transmission electron microscopy. *Cereal Chemistry* 55, 392-401.
- Belton, P.S., 1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* 29, 103-107.
- Belton, P.S., 2005. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science* 41, 203-212.
- Belton, P.S., Dobraszczyk, B.J., 2006. Letter to the editor. *Journal of Cereal Science* 43, 258.
- Belton, P.S., 2007. Letter to the editor. *Journal of Cereal Science* 46, 97-98.
- Bernardin, J.E., Kasarda, D.D., 1973a. Hydrated protein fibril from wheat endosperm. *Cereal Chemistry* 50, 529-536.

- Bernardin, J.E., Kasarda, D.D., 1973b. The microstructure of wheat protein fibril. *Cereal Chemistry* 50, 735-745.
- Bietz, J.A., Wall, J.S., 1972. Wheat gluten subunits: molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry* 49, 416-430.
- Bloksma, A.H., 1990. Dough structure, dough rheology, and baking quality. *Cereal Food World* 35, 237-244.
- Bohn, I.J., Bailey, C.H., 1936. Effect of mixing on the physical properties of dough. *Cereal Chemistry* 13, 560-575.
- Bot, A., de Bruijne, D.W., 2003. Osmotic properties of gluten. *Cereal Chemistry* 80, 404-408.
- Bottomley, R.C., Kearns, H.F., Schofield, J.D., 1982. Characterisation of wheat flour and gluten proteins using buffers containing sodium dodecyl sulphate. *Journal of Science and Food and Agriculture* 33, 481-491.
- Brito-de la Fuente, E., Leuliet, J.C., Choplin, L., Tanguy, P.A., 1991. On the role of elasticity on mixing with a helical ribbon impeller. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers* 69, 331-334.
- Bushuk, W., Hlynka, I., 1964. Water as a constituent of flour, dough, and bread. *Baker's Digest* 38, 43-47.
- Bushuk, W., 1966. Distribution of water in dough and bread. *Baker's Digest* 40, 38-40.
- Bushuk, W., Wrigley, C.W., 1974. Proteins: composition, structure and function. In: *Wheat: Production and Utilization*, ed G.E. Inglett, Avi. Pub. Co., Westport, CT, pp 119-145.
- Bushuk, W., Hay, R.L., Larsen, N.G., Sara, R.G., Simmons, L.D., Sutton, K.H., 1997. Effect of mechanical dough development on the extractability of wheat storage proteins from bread dough. *Cereal Chemistry* 74, 389-395.
- Calderon-Dominguez, G., Neya-Guevara, M., Farrera-Rebollo, R., Arana-Errasquin, R., Mora-Escobedo, R., 2003. Structural and farinographic changes during mixing of a yeast sweet dough. *Nahrung-Food* 47, 312-319.
- Campos, D.T., Steffe, J.F., Ng, P.K.W., 1996. Mixing wheat flour and ice to form undeveloped dough. *Cereal Chemistry* 73, 105-107.
- Campos, D.T., Steffe, J.F., Ng, P.K.W., 1997. Rheological behavior of undeveloped and developed dough. *Cereal Chemistry* 74, 489-494.
- Carreau, P.J., Chhabra, R.P., Cheng, J., 1993. Effect of rheological properties on power consumption with helical ribbon agitators. *Journal of American Institute of Chemical Engineers* 39, 1421-1430.

- Chamberlain, N., Collins, T.H., Elton, G.A.H., 1967. The Chorleywood bread process: effect of rate of dough mixing. FMBRA Report No 1, Flour Millers and Bakers Research Association, Chorleywood, UK.
- Cleemput, G., Roels, S.P., van Oort, M., Grobet, P.J., Delcour, J.A., 1993. Heterogeneity in the structure of water-soluble arabinoxylans in european wheat flours of variable bread-making quality. *Cereal Chemistry* 70, 324-329.
- Colonna, P., Buléon, A., 1992. New insights on starch structure and properties. In: *Cereal Chemistry and Technology: a Long Past and a Bright Future. Proceedings 9th International Cereal and Bread Congress*, pp 25-42.
- Cornec, M., Popineau, Y., Lefebvre, J., 1994. Characterization of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *Journal of Cereal Science* 19, 131-139.
- Coussot, P., Ancey, A., 1999. Rheophysical classification of concentrated suspensions and granular pastes. *Physical Review E* 59, 4445-4457.
- Coussot, P., 2005. Experimental procedures and problems in paste viscometry: thixotropy. In: *Rheometry of Pastes, Suspensions, and Granular Materials*, eds Wiley-Interscience.
- Cuq, B., Abecassis, J., Guilbert, S., 2003. State diagrams to help describe wheat bread processing. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 759-766.
- Dachkevitch, T., Autran, J.C., 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 66, 448-456.
- Danno, G., Hosney, R.C., 1982. Effect of sodium chloride and sodium dodecyl sulfate on mixograph properties. *Cereal Chemistry* 59, 202-204.
- D'Appolonia, B.L., Gilles, K.A., 1971. Effect of various starches in baking. *Cereal Chemistry* 48, 625-636.
- Delaplace, G., Leuliet, J.C., Ronse, G., 2000. Power requirement when mixing a shear-thickening fluid with a helical ribbon impeller type. *Chemical Engineering and Technology* 23, 329-336.
- Delaplace, G., Bouvier, L., Moreau, A., Guerin, R., Leuliet, J-C, 2004. Determination of mixing time by colourimetric diagnosis - Application to a new mixing system. *Experiments in Fluids* 36, 437-443.
- Delaplace, G., Guerin, R., Leuliet, J.C, 2005. Dimensional analysis for planetary mixer: modified power and reynolds numbers. *Journal of American Institute of Chemical Engineers* 51, 1-7.
- Delaplace, G., Thakur, R.K., Bouvier, L., Andre, C., Torrez, C., 2006. Dimensional analysis for planetary mixer: mixing time and Reynolds numbers. *Chemical Engineering Science* 62, 1442-1447.

- Dervilly, G., Rimsten, L., Saulnier, L., Andersson, R., Aman, P., 2001. Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. *Journal of Cereal Science* 34, 207-214.
- Dexter, J.E., Matsuo, R.R., 1979. Effect of water content on changes in semolina proteins during dough-mixing. *Cereal Chemistry* 56, 15-19.
- Dimler, R.J., 1963. Gluten – The key to wheat’s utility. *Baker’s Digest* 37, 52-57.
- Domenek, S., Brendel, L., Morel, M.H., Guilbert, S., 2004. Swelling behavior and structural characteristics of wheat gluten polypeptide films. *Biomacromolecules* 5, 1002-1008.
- Don, C., Lichtendonk, W.J., Plijter, J.J., Hamer, R.J., 2003. Understanding the link between GMP and dough: from glutenin particles in flour towards developed dough. *Journal of Cereal Science*, 38, 157-165.
- Don, C., 2005a. Factors affecting the hyper-aggregation of glutenin particles. Thesis Wageningen University, The Netherlands.
- Don, C., Lichtendonk, W.J., Plijter, J.J., van Vliet, T., Hamer, R.J., 2005b. The effect of mixing on glutenin particle properties: aggregation factors that affect gluten function in dough. *Journal of Cereal Science* 41, 69–83.
- Eliasson, A.C., Larsson, K., 1993. In: *Cereals in Breadmaking. A Molecular Colloidal Approach*, eds A.C. Eliasson and K. Larsson, Marcel Dekker, New York.
- Endo, S., Tanaka, K., Nabao, S., 1985. Studies on dough development. II. Effects of mixing apparatus and mixing speed on the rheological and analytical properties of heated doughs. *Cereal Chemistry* 62, 272-275.
- Evers, A.D., 1971. Scanning electron microscopy of wheat starch. III. Granule development in the endosperm. *Starch* 23, 157-162.
- Ewart, J.A.D., 1967. Amino acid analyses of glutenins and gliadins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 18, 111-116.
- Ewart, J.A.D., 1968. A hypothesis for the structure and rheology of glutenin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 617-632.
- Ewart, J.A.D., 1990. Thiols in flour and backing quality. *Food Chemistry* 38, 41-60.
- Fall, A., Huang, N., Bertrand, F., Ovarlez, G., Bonn, D., 2008. Shear thickening of cornstarch suspensions as a reentrant jamming transition. *Physical Review Letters* 100.018301, 1-4.
- Feillet, P., 1988. Protein and enzyme composition of durum wheat. AACC, St Paul, MN.
- Feillet, P., 2000. In: *Le grain de blé. Composition et utilisation*, INRA Edition, Paris.

- Fellers, D.A., 1973. Fractionation of wheat into major components. In: *Industrial Uses of Cereals*, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp. 207–228.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. In: *Advances in Cereal Sciences*, vol 8, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, pp 207-295.
- Fisher, M.H., Aitken, T.R., Anderson, J.A., 1949. Effect of mixing, salt and consistency on extensograms. *Cereal Chemistry* 26, 81-87.
- Frazier, P.J., Daniels, N.W.R., Russell-Eggitt, P.W., 1975. Rheology and the continuous breadmaking process. *Cereal Chemistry* 52, 106-130.
- Frederix, S.A., Courtin, C.M., Delcour, J.A., 2004. Influence of process parameters on yield and composition of gluten fractions obtained in a laboratory scale dough batter procedure. *Journal of Cereal Science* 39, 29–36.
- French, D., 1984. Organization of starch granules. In: *Starch Chemistry and Technology*, 2nd edition, eds R.L. Whistler, J.N. BeMiller and E.F. Paschal, Academic Press, New York, pp 183-212.
- Gaines, C.S., Donelson, J.R., Finney, P.L., 1988. Effects of damaged starch, chlorine gas, flour particule size, and dough holding time and temperature on cookie dough handling properties and cookie size. *Cereal Chemistry* 65, 384-389.
- Gao, L., Ng, P.K.W., Bushuk, W., 1992. Structure of glutenin based on farinograph and electrophoretic results. *Cereal Chemistry* 69, 452-455.
- Girhammar, U., Nair, B.M., 1992. Isolation, separation and characterization of water-soluble non starch polysaccharides from wheat and rye. *Food Hydrocolloids* 6, 285-299.
- Godon, B., Leblanc, M.P., Popineau, Y., 1983. A small scale device for wheat gluten separation. *Quality of Plant Foods for Human Nutrition* 33, 161-168.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W.S., Courtin, C.M., Gebruers, K., Delcour, J.A., 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology* 16, 12-30.
- Gras, P.W., Carpenter, H.C., Anderssen, R.S., 2000. Modelling the developmental rheology of wheat-flour dough using extension tests. *Journal of Cereal Science* 31, 1-13.
- Graveland, A., Bongers, P., Bosveld, P., 1979. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30, 71-84.
- Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Moonen, J.H.E., 1980. Superoxide involvement in the reduction of disulfide bonds of wheat gel proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93, 1189-1195.
- Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Moonen, J.H.E., 1982. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *Journal of Science of Food and Agriculture* 33, 1117-1128.

- Graveland, A., 1984. In: Proceedings of the 2nd International Gluten Workshop on Gluten Proteins, eds A. Graveland and J.H.E. Moonen, Pudoc, Wageningen, pp. 59–67.
- Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Marseille, J.P., Moonen, J.H.E., Scheepstra, A., 1985. A model for the molecular structure of the glutenins from wheat flour. *Journal of Cereal Science* 3, 1-16.
- Greer, E.N., Stewart, B.A., 1959. The water absorption of wheat flour: relative effects of protein and starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10, 248-252.
- Grosch, W., Wieser, H., 1999. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science* 29, 1-16.
- Gruppen, H., Kormelink, F.J.M., Voragen, A.G.J., 1993. Water-unextractable cell-wall material from wheat flour. 3. A structural model for arabinoxylans. *Journal of Cereal Science* 18, 111-128.
- Gupta, R.B., Batey, I.L., MacRitchie, F., 1992. Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal Chemistry* 69, 125-131.
- Hall, K.R., Godfrey, J.C., 1970. Power consumption by helical ribbon impeller. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers* 48, 201-208.
- Hamer, R.J., Weegels, P.L., Marseille, J.P., Kelfkens, M., 1989. A study of the factors affecting the separation of wheat flour into starch and gluten. In: *Wheat is Unique: Structure, Composition, Processing, End-use Properties, and Products*, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp. 467–477.
- Hamer, R.J., Weegels, P.L., Marseille, J.P., 1992. Prediction of the breadmaking quality of wheat: the use of HMW glutenin-A subunit based quality scoring systems. *Journal of Cereal Science* 15, 91-102.
- Hamer, R.J., van Vliet, T., 2000. Understanding the structure and properties of gluten: an overview. In: *Wheat Gluten*, eds P.R. Shewry and A.S. Thatam, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p125-131.
- Hamer, R.J., van Vliet, T., Lefebvre, J., 2005. Letter to the editor. *Journal of Cereal Science* 42, 344-345.
- Haraszi, R., Larroque, O.R., Butow, B.J., Gale K.R. and Bekes F., 2008. Differential mixing action effects on functional properties and polymeric protein size distribution of wheat dough. *Journal of Cereal Science* 47, 41-51.
- Heddleson, S.S., Hamann, D.D., Lineback, D.R., 1993. The Dahlquist criterion – Applicability of a rheological criterion to the loss of pressure sensitive tack in flour-water dough. *Cereal Chemistry* 70, 744-748.
- Hilbert, G.E., Dimler, R.J., Rist, C.E., 1944. Wheat flour – A potential raw material for the expanded production of starch and sirups. *American Miller* 72, 78-80.

- Hlynka, I., 1962. Influence of temperature, speed of mixing, and salt on some rheological properties of dough in the farinograph. *Cereal Chemistry* 39, 286-303.
- Hoseney, R.C., Faubion, J.M., 1981. A mechanism for the oxidative gelation of wheat flour-soluble pentosans. *Cereal Chemistry* 58, 421-424.
- Hoseney, R.C., Rogers, D.E., 1990. The formation and properties of wheat flour doughs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29, 73-93.
- Hoseney, R.C., 1992. Physical chemistry of bread dough. In: *Physical Chemistry of Foods*, eds H.G. Schwartzberg, R.W. Hartel and M. Dekker, New York, pp. 443–456.
- Hoseney, R.C., 1994. *Principles of Cereal Science and Technology*, 2nd edition, AACC, St Paul, MN, USA.
- Huebner, F.R., Wall, J.S., 1976. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. *Cereal Chemistry* 53, 258-269.
- Huebner, F.R., Wall, J.S., 1980. Wheat glutenin: effect of dissociating agents on molecular weight and composition as determined by gel filtration chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 28, 433-438.
- Imeson, A.P., Ledward, D.A., Mitchell, J.R., 1977. On the nature of the interactions between some anionic polysaccharides and proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 669-672.
- International Association for Cereal Science and Technology, 1992. Method for using the Chopin alveograph, ICC Standard Method, No. 121, Vienna, Austria.
- Irvine, G.N., Bradley, J.W., Martin, G.C., 1961. A farinograph technique for macaroni doughs. *Cereal Chemistry* 38, 153-164.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and chemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28, 33-48.
- Janssen, A.M., van Vliet, T., Vereijken, J.M., 1996. Rheological behaviour of wheat glens at small and large deformations. Effect of gluten composition. *Journal of Cereal Science* 23, 33-42.
- Jelaca, S.L., Hlynka, I., 1971. Water-binding capacity of wheat flour crude pentosans and their relation to mixing characteristics of dough. *Cereal Chemistry* 48, 211-222.
- Johnston, P.H., Fellers, D.A., 1971. Process for protein–starch separation in wheat flour, 2. Experiments with a continuous decanter-type centrifuge. *Journal of Food Science* 36, 649–652.
- Jongen, T.R.G., 2000. Characterization of batch mixers using numerical flow simulations. *Journal of American Institute of Chemical Engineers* 46, 2140-2150.

- Jongen, T.R.G., Bruschke, M.V., Dekker, J.G., 2003. Analysis of dough kneaders using numerical flow simulations. *Cereal Chemistry* 80, 383-389.
- Karlsson, R., Olered, R., Eliasson, A.C., 1983. Changes in starch granule size distribution and starch gelatinisation properties during development and maturation of wheat, barley and rye. *Starch* 35, 335-340.
- Kasarda, D.D., Bernardin, J.E., Nimmo, C.C., 1976. Wheat proteins. In: *Advances in Cereal Science and Technology*, vol I, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp 158-236.
- Kasarda, D.D., 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. In: *Wheat is unique*, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp. 277-302.
- Kaufman, S.P., Hoseney, R.C., Fennema, O., 1986. Dough rheology – A review of structural models and the role of disulphide interchange reactions. *Cereal Foods World* 31, 820-824.
- Keck-Gassenmeier, B., Wieser, H., 1996. Disulfide bonds in acetic acid soluble and insoluble glutenin fractions. In: *Gluten'96*, ed C.W. Wrigley, Sydney, pp 145-148.
- Kempf, W., Röhrmann, C., 1989. Process for the industrial production of wheat starch from whole wheat. In: *Wheat is Unique: Structure, Composition, Processing, End-use Properties, and Products*, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp 521-540.
- Khatkar, B.S., Bell, A.E., Schofield, J.D., 1995. The dynamic rheological properties of gluteins and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. *Journal of Cereal Science* 22, 29-44.
- Kieffer, R., Stein, N., 1999. Demixing in wheat doughs - Its influence on dough and gluten rheology. *Cereal Chemistry* 76, 688-693.
- Kieffer, R., 2006a. Mechanism of emulsifiers in wheat dough. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Food Rheology and Structure*, Eds P. Fischer, P. Erni and E. Windhab, pp 569-571.
- Kieffer, R., 2006b. Observations on the rheopectic properties of starches from different sources: the influence of the granule size distribution and shape on the rheological properties and the processing properties of wheat dough. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Food Rheology and Structure*, Eds P. Fischer, P. Erni and E. Windhab, pp 591-592.
- Kilborn, R.H., Tipples, K.H., 1972. Factors affecting mechanical dough development. I. Effect of mixing intensity and work input. *Cereal Chemistry* 49, 34-47.
- Kim, S.K., D'Appolonia, B.L., 1977. Bread staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread, and bread staling rate. *Cereal Chemistry* 54, 225-229.
- Knight, J.W., Olson, R.M., 1984. Wheat starch: production, modification, and uses. In: *Starch: Chemistry and Technology Industrial Aspects*, vol. II., eds R.L. Whistler and E.F. Paschall, Academic Press, New York, pp 491-506.

- Köhler, P., Belitz, H.D., Wieser, H., 1993. Disulphide bonds in wheat gluten. Further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from γ -gliadins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 196, 239-247.
- Krieger, I.M., Dougherty, T.J., 1959. A mechanism for non-Newtonian flow in suspensions of rigid spheres. *Journal of Rheology* 3, 137-152.
- Lancaster, E.B., Anderson, R.A., 1958. Consistency measurements on batters, doughs and pastes. *Cereal Chemistry* 36, 420-429.
- Landin, M., York, P.,Cliff, M.J., Rowe, R.C., 1999. Scale-up of a pharmaceutical granulation in planetary mixers. *Pharmaceutical Development and Technology* 4, 145-150.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., de Kruiff, C.G., 1999. Casein micelle/iota-carrageenan interactions in milk: influence of temperature. *Food Hydrocolloids* 13, 211-218.
- Larsen, R.A., 1964. Hydration as a factor in bread flour quality. *Cereal Chemistry* 41, 181-187.
- Larsen, N.G., Greenwood, D.R., 1991. Water addition and the physical properties of mechanical dough development of doughs and breads. *Journal of Cereal Science* 13, 195-205.
- Launay, B., Bartolucci, J.C., 1997. Comportement rhéologique des pâtes et des produits finis. In: *Guide Pratique d'Analyses dans les Industries des Céréales*, pp 121-174.
- Lee, L., Ng, P.K.W., Whallon, J.H., Steffe, J.F., 2001. Relationship between rheological properties and microstructural characteristics of nondeveloped, partially developed, and developed doughs. *Cereal Chemistry* 78, 447-452.
- Lefebvre, J., Popineau, Y., Cornec, M., 1993. Viscoelastic properties of gluten proteins: influence of prolamins composition and of temperature. In: *Gluten Proteins*, eds W. Seibel and W. Bushuk, Association of Cereal Research, Detmold, Germany, p180-190.
- Lefebvre, J., Popineau, Y., Deshayes, G., Lavenant, L., 2000. Temperature-induced changes in the dynamic rheological behaviour and size distribution of polymeric proteins for gluteins from wheat near isogenic lines differing in HMW glutenin subunit composition. *Cereal Chemistry* 77, 193-201.
- Lefebvre, J., Pruska-Kedzior, A., Kedzior, Z., Lavenant, L., 2003. A phenomenological analysis of wheat gluten viscoelastic response in retardation and in dynamic experiments over a large time scale. *Journal of Cereal Science* 38, 257-267.
- Lindsay, M.P., Skerritt, J.H., 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends in Food Science and Technology* 10, 247-253.
- Lin-Gibson, S., Pathak, J. A., Grulke E. A., Wang H., Hobbie, E. K., 2004. Elastic flow instability in nanotube suspensions. *Physical Review Letters* 92, 048302.

- MacMaster, T.J., Miles, M.J., Kasarda, D.D., Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1999. Atomic force microscopy of a A-gliadin fibrils and in situ degradation. *Journal of Cereal Science* 31, 281-286.
- MacRitchie, F., 1975. Mechanical degradation of gluten proteins during high-speed mixing of doughs. *Journal of Polymer Science* 49, 85-90.
- MacRitchie, F., 1978. Differences in baking quality between wheat flours. *Food Technology* 13, 187-194.
- MacRitchie, F., 1980. Studies of gluten protein from wheat flours. *Cereal Foods World* 25, 382-385.
- MacRitchie, F., 1984. Baking quality of wheat flours. *Advanced Food Research* 29, 201-277.
- MacRitchie, F., 1999. Characterization and role in flour functionality. *Cereal Foods World* 44, 188-193.
- MacRitchie, F., 2007. Letter to the editor. *Journal of Cereal Science* 46, 96-97.
- Mandelbrot, 1973. In: *Les Objets fractals: Forme, Hasard, et Dimension*.
- Mani, K., Trägårdh, C., Eliasson, A.C., Lindahl, L., 1992. Water content, water soluble fraction, and mixing affect fundamental rheological properties of wheat flour doughs. *Journal of Food Science* 57, 1198-1209.
- Mansoutre, S., Colombet, P., van Damme, H., 1999. Water retention and granular rheological behavior of fresh C₃S paste as a function of concentration. *Cement and Concrete Research* 29, 1441-1453.
- Mares, D.J., Stone, B.A., 1973. Studies on wheat endosperm. I. Chemical composition and ultrastructure of the cell walls. *Australian Journal of Biological Sciences* 26, 793-812.
- Markley, M.C., Bailey, C.H., 1939. The colloidal behavior of flour doughs. V. Comparison of the increase in mobility of doughs upon either prolonged mixing or fermentation with the effects of varied mixing times upon loaf characteristics. *Cereal Chemistry* 16, 265-271.
- Masci, S., Egorov, T.A., Ronchi, C., Kuzmicky, D.D., Kasarda, D.D., Lafiandra, D., 1999. Evidence for the presence of only one cysteine residue in the D-type low molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science* 29, 17-25.
- Matsuo, R.R., Dexter, J.E., Dronzek, B.L., 1978. Scanning electron microscopy study of spaghetti processing. *Cereal Chemistry* 55, 744-753.
- Mecham, D.K., Sokol, H.A., Pence, J.W., 1962. Extractable protein and hydration characteristics of flours and doughs in dilute acid. *Cereal Chemistry* 39, 81-93.
- Mecham, D.K., Cole, E.G., Pence, J.W., 1965. Dough-mixing properties of crude and purified glutens. *Cereal Chemistry* 42, 409-420.

- Medcalf, D.G., Gilles, K.A., 1965. Wheat starches. I. Comparison of physicochemical properties. *Cereal Chemistry* 42, 558-568.
- Merritt, P.P., Bailey, C.H., 1939. Absorption mobility relationships in wheat-flour doughs. *Cereal Chemistry* 16, 377-383.
- Metzner, A.B., Otto, R.E., 1957. Agitation of non-Newtonian fluids. *Journal of American Institute of Chemical Engineers* 3, 3-10.
- Meuser, F., Suckow, P., 1986. Non-starch polysaccharides. In: *Chemistry and Physics of Baking*, eds J.M.V. Blanshard, P.J. Frazier and T. Galliard, The Royal Society of Chemistry, London, pp 42-61.
- Meuser, F., Althoff, F., Huster, H., 1989. Developments in the extraction of starch and gluten from wheat flour and wheat kernels. In: *Wheat is Unique*, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp 479-499.
- Montesi, A., Peña, A. A., Pasquali, M., 2004. Vorticity alignment and negative normal stresses in sheared attractive emulsions. *Physical Review Letters* 92, 058303.
- Moonen, J.H.E., Scheepstra, A., Graveland, A., 1986. Use of the SDS-sedimentation test and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for screening breeder's samples of wheat for bread-making quality. *Euphytica* 31, 677-690.
- Moore, C.L., Herman, R.S., 1942. The effect of certain ingredients and variations in manipulations on the farinograph curve. *Cereal Chemistry* 19, 568-587.
- Moore, A.M., Hosney, R.C., 1990. Factors affecting the viscosity of flour-water extracts. *Cereal Chemistry* 67, 78-80.
- Morel, M.H., Bar-L'Helgouac'h, C., 2000. Reliable estimates of gliadin, total and unextractable glutenin polymers and total protein contents, from single SE-HPLC analysis of total wheat flour protein extract. In: *Wheat gluten*, eds P.R. Shewry and A.S. Tatham, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p140-144.
- Morel, M.H., Dehlon, P., Autran, J.C., Leygue, J.P., Bar-L'Helgouac'h, C., 2000. Effects of temperature, sonication time and power settings on the size-distribution and the extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 77, 685-691.
- Morel, M.H., Redl, A., Guilbert, S., 2002. Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules* 3, 488-497.
- Moss, R., Gore, P.J., Murray, I.C., 1987. The influence of ingredients and processing variables on the quality and microstructure of Hokkien, Cantonese and instant noodles. *Food Microstructure* 6, 63-74.
- Müller, S., Wieser, H., 1995. The location of disulphide bonds in α -type gliadins. *Journal of Cereal Science* 22, 21-27.

- Nagata, S., Nishikawa, M., Hisayuki, T., Gotoh, S., 1971. Power consumption of mixing impellers in pseudoplastic fluids. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 4, 72-76.
- Neukom, H., Markwalder, H.U., 1978. Oxidative gelation of wheat flour pentosans: a new way of cross-linking polymers. *Cereal Food World* 23, 374-394.
- Orth, R.A., Bushuk, W., 1972. A comparative study of the proteins of wheats of diverse backing qualities. *Cereal Chemistry* 49, 268-275.
- Osborne, T.B., 1907. The proteins of the wheat kernel. Publ. 84. Carnegie Inst., Washington, DC.
- Osuji C. O., Weitz D., 2007. Highly anisotropic vorticity aligned structures in a shear thickening attractive colloidal system. *Soft Condensed Matter*, arXiv:0710.4336v1.
- Parades-Lopez, O., Bushuk, W., 1983a. Development and “undevelopment” of wheat dough by mixing: physicochemical studies. *Cereal Chemistry* 60, 19-23.
- Parades-Lopez, O., Bushuk, W., 1983b. Development and “undevelopment” of wheat dough by mixing: microscopic structure and its relations to bread-making quality. *Cereal Chemistry* 60, 24-27.
- Patil, S.K., Tsen, C.C., Lineback, D.R., 1975. Water-soluble pentosans of wheat flour. I. Viscosity properties and molecular weights estimated by gel filtration. *Cereal Chemistry* 52, 44-56.
- Payne, P.I., Holt, L.M., Law, C.N., 1981. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. Part 1: allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (*Triticum aestivum*). *Theoretical and Applied Genetics* 60, 229-236.
- Peighambardoust, S.H., van der Goot, A.J., Hamer, R.J., Boom, R.M., 2004. A new method to study simple shear processing of wheat gluten-starch mixtures. *Cereal Chemistry* 81, 714-721.
- Peighambardoust, S.H., van der Goot, A.J., Boom, R.M., Hamer, R.J., 2006a. Mixing behaviour of a zero-developed dough compared to a flour-water mixture. *Journal of Cereal Science* 44, 12-20.
- Peighambardoust, S.H., van der Goot, A.J., van Vliet, T., Hamer, R.J., Boom, R.M., 2006b. Microstructure formation and rheological behaviour of dough under simple shear flow. *Journal of Cereal Science* 43, 183-197.
- Peighambardoust, S.H., van Brenk, S., van der Goot, A.J., Hamer, R.J., Boom, R.M., 2007. Dough processing in a Couette-type device with varying eccentricity: effect on glutenin macro-polymer properties and dough micro-structure. *Journal of Cereal Science* 45, 34-48.

- Peressini, D., Peighambaroust, S.H., Hamer, R.J., Sensidoni, A., van der Goot, A.J., 2007. Effect of shear rate on microstructure and rheological properties of sheared wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, doi: 10.1016/j.jcs.2007.10.008
- Piculell, L., Lindman, B., 1992. Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences. *Advances in Colloid and Interface Science* 41, 149-178.
- Pignon, F., Magnin, A., Piau, J. M., 1997. Butterfly light scattering pattern and rheology of a sheared thixotropic clay gel. *Physical Review Letters* 79, 4689.
- Pomeranz, Y., 1965. Dispersibility of wheat proteins in aqueous urea solutions – New parameter to evaluate bread-making potentialities of wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 16, 586-593.
- Pomeranz, Y., 1988. Composition and functionality of wheat flour components. In: *Wheat: Chemistry and Technology*, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp 219-370.
- Pommet, M., Redl, A., Guilbert, S., Morel, M.H., 2005. Impact of protein size distribution on gluten thermal reactivity and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3943-3949.
- Popineau, Y., Cornec, M., Lefebvre, J., Marchylo, B., 1994. Influence of high M_r glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of gluteins and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat Sicco. *Journal of Cereal Science* 19, 231-241.
- Posner, E., 2000. Wheat. In: *Handbook of Cereal Science and Technology*, 2nd edition, eds K. Kulp and J.G. Ponte Jr., Marcel Dekker, New York, pp 9-19.
- Pritchard, P.E., Brock, C.J., 1994. The glutenin fraction of wheat protein: the importance of genetic background on its quantity and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, 401-406.
- Quemada, D., Berli, C., 2002. Energy of interaction in colloids and its implications in rheological modeling. *Advances in Colloid and Interface Science* 98, 51-85.
- Rattan, O., Izydorzyc, M., Biliaderis, C.G., 1994. Structure and rheological behaviour of arabinoxylans from Canadian bread wheat flours. *Food Science and Technology* 27, 550-555.
- Rebello, C. A., Schaich, K. M., 1999. Extrusion chemistry of wheat flour proteins: II. Sulfhydryl–disulfide content and protein structural changes. *Cereal Chemistry* 76, 756–763.
- Redl A., Morel, M.H., Bonicel, J., Vergnes, B., Guilbert, S., 1999. Extrusion of wheat gluten plasticized with glycerol: influence of process conditions on flow behavior, rheological properties, and molecular size distribution. *Cereal Chemistry* 76, 361-370.

- Rieger, F., Novak, V., 1973. Power consumption of agitators in highly viscous non-Newtonian liquids. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers* 51, 105-111.
- Rist, C.E., 1949. Batter process makes wheat flour source of gluten and starch. *Sugar Journal*, 11, 26.
- Robertson, G.H., Cao, T.K., 1998. Substitution of concentrated ethanol for water in the laboratory washing fractionation of protein and starch from hydrated wheat flour. *Cereal Chemistry* 75, 508-513.
- Robertson, G.H., Cao, T.K., Wood, D.F., 2000. Effect of morphology of the mechanically developed wheat flour and water on starch from gluten separation using cold ethanol displacement. *Cereal Chemistry* 77, 439-444.
- Robertson, G.H., Gregorski, K.S., Cao, T.K., 2006. Changes in secondary structures during mixing development of high absorption (90%) flour and water mixtures. *Cereal Chemistry* 83, 136-142.
- Roels, S.P., Sindic, M., Deroanne, C., Delcour, J.A., 1998. Protein composition and agglomeration tendency of gluten isolated from European wheats (*Triticum aestivum* L.) in a batter system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1344-1349.
- Roman-Gutierrez, A.D., Mabilie, F., Guilbert, S., Cuq, B., 2003a. Contribution of specific flour components to water vapor adsorption properties of wheat flours. *Cereal Chemistry* 80, 558-563.
- Roman-Gutierrez, A., Sabathier, J., Guilbert, S., Galet, L., Cuq, B., 2003b. Characterization of the surface hydration properties of wheat flours and flour components by the measurement of contact angle. *Powder Technology* 129, 37-45.
- Rouau, X., Surget, A., 1994. A rapid semiautomated method for the determination of total and water-extractable pentosans in wheat flours. *Carbohydrate Polymers* 24, 123-132.
- Sai Manohar, R.S., Haridas Rao, P., 1992. Use of a penetrometer for measuring rheological characteristics of biscuit dough. *Cereal Chemistry* 69, 619-623.
- Sapirstein, H.D., Suchy, J., 1999. SDS-protein gel test for prediction of bread loaf volume. *Cereal Chemistry* 76, 164-172.
- Schofield, J.D., 1986. Flour proteins. In: *Structure and Functionality in Baked Products*, eds J.M.V. Blanshard, P.J. Frazier and T. Galliard, The Royal Society of Chemistry, London, UK, p14-19.
- Schroeder, L.F., Hoseney, R.C., 1978. Mixograph studies. II. Effect of activated double-bond compounds on dough-mixing properties. *Cereal Chemistry* 55, 348-360.
- Shamlou, P.A., Edwards, M.F., 1985. Power consumption of helical ribbon mixers in viscous Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chemical Engineering Science* 40, 1773-1781.

- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M., Mifflin, B.J., 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science* 4, 97-106.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science* 25, 207-227.
- Shewry, P.R., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P.S., 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science and Technology* 11, 433-441.
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P.S., 2003. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Advances in Food and Nutrition Research* 45, 219-302.
- Sidhu, J.S., Nordin, P., Hosene, R.C., 1980. Mixograph studies. III. Reaction of fumaric acid with gluten proteins during dough mixing. *Cereal Chemistry* 57, 159-163.
- Sindic, M., Chevalier, O., Duculot, J., Foucart, M., Deroanne, C., 1993. Fractionnement du froment d'hiver: influences variétale et phytotechnique. *Industrie des Céréales* 2, 3-7.
- Singh, H., MacRitchie, F., 2001. Application of polymer science to properties of gluten. *Journal of Cereal Science* 33, 231-243.
- Skeggs, P.K., 1985. Mechanical dough development – Dough water level and flour protein quality. *Cereal Chemistry* 62, 458-462.
- Skerritt, J.H., Hac, L., Bekes, F., 1999. Depolymerization of the glutenin macropolymer during dough mixing: I. Changes in levels, molecular weight distribution, and overall composition. *Cereal Chemistry* 76, 395-401.
- Soulaka, A.B., Morrison, W.R., 1985. The amylose and lipid contents, dimensions, and gelatinisation characteristics of some wheat starches and their A- and B-granule fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36, 709-718.
- Stamberg, O.E., Bailey, C.H., 1938. Relationship of mixing speed to dough development. *Cereal Chemistry* 22, 214-222.
- Surget, A., Barron, C., 2005. Histologie du grain de blé. *Industrie des Céréales* 145, 3-7.
- Swift, J.G., O'Brien, T.P., 1972. The fine structure of wheat scutellum before germination. *Australian Journal of Biology* 19, 63-71.
- Takahashi, K., Yokota, T., Konno, H., 1984. Power consumption of helical ribbon agitators in highly viscous pseudoplastic liquids. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 17, 657-659.
- Tanaka, K., Bushuk, W., 1973. Changes in flour proteins during dough-mixing. I. Solubility results. *Cereal Chemistry* 50, 590-596.

- Tanguy P.A., Bertrand F., Labrie R., Brito-de la Fuente E., 1996. Numerical modelling of the mixing of viscoplastic slurries in a twin blade planetary mixer. *Chemical Engineering Research and Design* 74, 499-504.
- Tanguy, P.A., Thibault, F., Dubois, C., Aït-Kadi, A., 1999. Mixing hydrodynamics in a double planetary mixer. *Chemical Engineering Research and Design* 77, 318-323.
- Tatham, A.S., Shewry, P.R., 1985. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of alpha-, beta-, gamma- and omega-gliadins. *Journal of Cereal Science* 3, 103-113.
- Tatham, A.S., Mifflin, B.J., Shewry, P.R., 1985. The β -turn conformation in wheat gluten proteins: relationship to gluten elasticity. *Cereal Chemistry* 62, 405-412.
- Tipples, K.H., Kilborn, R.H., 1975. "Unmixing" - The disorientation of developed bread doughs by slow mixing speed. *Cereal Chemistry* 52, 248-262.
- Tolstoguzov, V.B., 1991. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interactions. Review. *Food Hydrocolloids* 4, 429-468.
- Tolstoguzov, V., 1997. Thermodynamic aspects of dough formation and functionality. *Food Hydrocolloids* 11, 181-193.
- Tsen, C.C., 1967. Changes in flour proteins during dough mixing. *Cereal Chemistry* 44, 308-317.
- Tsiami, A.A., Bot, A., Agterof, W.G.M., Groot, R.D., 1997. Rheological properties of glutenin subfractions in relation to their molecular weight. *Journal of Cereal Science* 26, 15-27.
- Udy, D.C., 1956. The intrinsic viscosities of water-soluble components of wheat flour. *Cereal Chemistry* 33, 67-74.
- van der Borgh, A., Goesart, H., Veraverbeke, W.S., Delcour, J.A., 2005. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science* 41, 221-237.
- van Vliet, T., Hamer, R.J., 2007. Letter to the editor. *Journal of Cereal Science* 46, 98-99.
- Veraverbeke, W.S., Delcour, J.A., 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Cereal Chemistry* 42, 179-208.
- Vermant J., Salomon, M. J., 2005. Flow-induced structure in colloidal suspensions. *Journal of Physics: Condensed Matter* 17, R187-R216.
- Wall, J.S., 1979. The role of wheat proteins in determining baking quality. In: *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals*, eds D.L. Laidman and R.G.W. Jones, Academic Press, New York, pp 275-311.

- Wang, M., van Vliet, T., Hamer, R.J., 2004. Evidence that pentosans and xylanase affect the re-agglomeration of the gluten network. *Journal of Cereal Science* 39, 341–349.
- Weegels, P.L., Orsel, R., van de Pijpekamp, A.M., Lichtendonk, W.J., Hamer, R.J., Schofield, J.D., 1995. Functional properties of low M_r wheat proteins. II. Effects on dough properties. *Journal of Cereal Science* 21, 117-126.
- Weegels, P.L., Hamer, R.J., Schofield, J.D., 1996. Critical review: functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science* 23, 1-18.
- Weegels, P.L., Hamer, R.J., Schofield, J.D., 1997. Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. II. Changes in composition. *Journal of Cereal Science* 25, 155–163.
- Wieser, H., Müller, S., 1996. Disulphide bonds of wheat gliadins. In: *Gluten'96*, ed C.W. Wrigley, Sydney, pp 169-172.
- Wilson, A.J., Wooding, A.R., Morgenstern, M.P., 1997. Comparison of work input requirement on laboratory-scale and industrial-scale mechanical dough development mixers. *Cereal Chemistry* 74, 715-721.
- Woychik, J.H., Boundy, J.A., Dimler, R.J., 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Archives Biochemistry Biophysics* 94, 477-482.
- Wrigley, C.W., Bietz, J.A., 1988. Proteins and amino acids. In: *Wheat Chemistry and Technology*, vol I, ed Y. Pomeranz, AACC, St Paul, MN, pp 159-275.
- Wrigley, C.C., 1996. Giant proteins with flour power. *Nature* 381, 738-739.
- Yeh, Y.F., Hoseney, R.C., Lineback, D.R., 1980. Changes in wheat flour pentosans as a result of dough mixing and oxidation. *Cereal Chemistry* 57, 144-148.
- Zhou, G., Tanguy, P.A., Dubois, C., 2000. Power consumption in a double planetary mixer with non-Newtonian and viscoelastic material. *Chemical Engineering Research and Design* 78, 445-453.

TRAVAUX RELATIFS

A CETTE ETUDE

Publications acceptées

Auger, F., Morel, M.H., Lefebvre, J., Dewilde, M., Redl, A., 2007. A parametric and microstructural study of the formation of gluten network in mixed flour-water batter. *Journal of Cereal Science*, doi: 10.1016/j.jcs.2007.10.006.

Publications en préparation

Auger, F., Morel, M.H., Dewilde, M., Redl, A., Delaplace G., 2008. Power consumption of a planetary mixer: application for the determination of apparent shear rate and viscosity of flour-water batters.

Auger, F., Morel, M.H., Dewilde, M., Redl, A., 2008. Influence of mixing on gluten protein recovery and composition. I. Extraction from optimally developed batters.

Auger, F., Morel, M.H., Dewilde, M., Redl, A., 2008. Influence of mixing on gluten protein recovery and composition. II. Extraction from under- and over-mixed batters.

Auger, F., Lefebvre, J., Redl, A., Morel, M.H., 2008. Influence of SDS-insoluble glutenin polymers on gluten elasticity for a constant glutenin to gliadin ratio.

Communications orales

Auger, F., Redl, A., Lefebvre, J., Morel, M.H., 2006. On the mechanism of gluten network development in flour-water batter dough. 9th International Gluten Workshop, September 14 – 16th 2006, San Francisco, USA. In: *Gluten Proteins 2006*, eds G.L. Lookhart and P.K.W. Ng, AACC, St Paul, MN, pp 284-289.

Auger, F., Redl, A., Lefebvre, J., Morel, M.H., 2007. Study of gluten network development in mixed batter dough. 6th European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop, April 30th - May 2nd 2007, Montpellier - La Grande Motte, France.

Auger, F., Redl, A., Morel, M.H., Guilbert, S., 2007. Etude des mécanismes d'agglomération des protéines de la farine de blé. 1^{ère} Journée de l'Ecole Doctorale Sciences des Procédés – Sciences des Aliments, 20 Juin 2007, Montpellier, France.

Posters

Auger, F., Morel, M.H., Lefebvre, J., Redl, A., Guilbert, S., 2007. Etude des mécanismes de formation du réseau de gluten au cours du pétrissage de mélanges farine-eau dilués. 58^{èmes} Journées Techniques des Industries Céréalières, 18-19 Octobre 2007, Paris, France. Poster publié le journal « Industries des Céréales », No. 156, janv-mars 2008, pp. 14-15.

Distinctions

Danone Biscuits and Cereal Foods Division Best Innovative Work Award lors du 6th European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop, April 30th - May 2nd 2007, Montpellier - La Grande Motte, France.

Prix de la meilleure communication orale lors de la 1^{ère} Journée de l'Ecole Doctorale Sciences des Procédés – Sciences des Aliments, 20 Juin 2007, Montpellier, France.

Etude des mécanismes d'agglomération du gluten au cours du pétrissage de suspensions farine-eau

Le pétrissage de la farine de blé en présence d'eau est une opération unitaire fondamentale pour les boulangers et les amidonniers car elle assure la formation du réseau visco-élastique de gluten au sein de la pâte. La formation d'un tel réseau, très rapide dans le cas de la pâte à pain, repose sur des mécanismes physiques et chimiques qui n'ont pas encore été clairement identifiés. Afin d'étudier ces mécanismes, notre approche s'est focalisée sur le pétrissage de pâtes diluées. La dilution, qui diminue la probabilité d'interactions et la contrainte de cisaillement, affecte la cinétique de développement du réseau de gluten. Contrairement à la pâte à pain, la courbe de développement d'une pâte diluée présente une phase de latence précédant la montée au pic caractéristique du développement optimal de la pâte (t_{peak}). L'étude a été réalisée dans un pétrin planétaire selon différentes conditions de pétrissage (hydratation et vitesse) pour trois variétés de blé différentes. La viscosité de la pâte pendant cette phase de latence est un paramètre important dans le contrôle de t_{peak} . Elle a pu être déterminée à partir de la mesure de la consistance de la pâte dans le pétrin en s'appuyant sur l'approche proposée par Metzner-Otto. L'ajout d'un colorant spécifique des protéines dans la pâte a permis de suivre *in situ* leur agglomération, qui repose sur deux processus successifs. Le premier induit la formation d'agrégats protéiques de taille croissante au cours de la phase de latence, tandis que le second induit leur transformation en de fins filaments de gluten. A l'échelle moléculaire, cette agglomération s'accompagne de la dépolymérisation des gluténines. Celle-ci, induite par la contrainte de cisaillement, est contre-balançée par une réaction antagoniste, inhibée par un agent bloqueur des thiols. Deux autres réactions contribuant à cette dépolymérisation ont par ailleurs été identifiées. L'une est spécifique à la variété tandis que l'autre, de portée générale, impliquerait une oxydation des gluténines par l'oxygène de l'air. Par la caractérisation rhéologique des glutens extraits de différentes pâtes, nous avons mis en évidence la relation qui unit le taux de dépolymérisation des gluténines et l'élasticité du gluten. La confrontation de l'ensemble de nos résultats avec les données de la littérature concernant la pâte à pain nous permet de proposer un mécanisme général rendant compte de la percolation du réseau de gluten dans n'importe quelle pâte, et cela quelle que soit sa teneur en eau. Cette étude démontre que l'utilisation de pâtes diluées offre de nouvelles possibilités de compréhension des mécanismes de formation du gluten.

Mots-clés : agglomération, agrégat protéique, cisaillement, déformation, gluten de blé, gluténines, Metzner-Otto, percolation, pétrissage, réseau protéique, suspension, teneur en eau, viscosité.

On the mechanisms of gluten network development during flour-water batter mixing

Mixing wheat flour with water is a fundamental unit operation for the breadmaking and starch industries because it ensures the formation of the viscoelastic gluten network. The formation of such a network, very fast in the case of bread dough, relies on physical and chemical mechanisms which were not clearly identified yet. In order to unravel these mechanisms, our approach focused on the mixing of batters. Dilution, which decreases the probability of interactions and the applied shear stress, affects the kinetic of gluten network development. In contrast to bread dough, the batter mixing curve shows a lag phase preceding the rise to peak related to the optimal batter development (t_{peak}). The work was carried out with a planetary mixer, for various mixing conditions (hydration and mixing speed) and for three wheat cultivars. The batter viscosity during the lag phase was revealed to be a control parameter of t_{peak} . It was deduced from the measured batter consistency by following the Metzner-Otto approach. By using a specific protein stain, we showed that gluten agglomeration relies on two successive events. The first induces the formation of large gluten lumps during the lag phase, while the second induces their transformation into fine gluten strands. At the molecular scale, gluten agglomeration coincided with glutenin depolymerization. The glutenin breakdown is induced by the shear stress and counterbalanced by an antagonistic reaction, inhibited by a thiol blocker reagent. Two other reactions acting on depolymerization were also identified. One is specific of the wheat cultivar, while the other would imply the oxidation of glutenin by oxygen species. From the rheological characterization of the glutens extracted from several batters, we highlighted a relation linking the extent of glutenin depolymerization to gluten elasticity. The confrontation of our results with the published data on bread doughs allows us to propose a general mechanism accounting for the percolation of the gluten network in mixed doughs, whatever their water content. This study shows that using batters offers new possibilities to understand the mechanisms of gluten network development.

Keywords: agglomeration, glutenins, Metzner-Otto, mixing, percolation, protein agglomerate, protein network, shear, strain, suspension, viscosity, water content, wheat gluten.